

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Caracterización funcional del silenciador del dominio α -globina de pollo
durante la diferenciación eritroide”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
ALEJANDRA BAUTISTA CAMACHO**

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA.

México, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Félix Recillas-Targa el brindarme, de manera desinteresada, la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo. Gracias por contagiarme el entusiasmo del descubrimiento y por hacer grato mi primer acercamiento a la investigación.

Asimismo agradezco a Martín Escamilla y Georgina Guerrero por su paciencia y apoyo incondicional; por enseñarme a trabajar día con día en el laboratorio, por sus consejos. A Héctor Rincón y a Paul Delgado por su disposición y empeño por aclarar mis dudas y mostrarme que en la ciencia hay más de una forma de alcanzar un fin. A Gianelli Cortés por facilitarme el trabajo cotidiano, estoy segura que sin ello todo sería un caos. A todos los miembros del laboratorio 122 Nte. del IFC; su compañía me ha enseñado que el trabajo en equipo es la mejor manera de alcanzar objetivos.

Por otra parte doy gracias a Sandra Hernández que, sin importar hora y día, me ayudó con las figuras de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a personas que, como Antonio Lee, han luchado porque este espacio nos brinde a todos la oportunidad de una formación profesional y competente. Al CONACYT y a la DGAPA que apoyaron con la adquisición de materiales y reactivos con los cuales es posible la realización de los proyectos de investigación de nuestro laboratorio.

Agradezco a toda mi familia por su confianza, en especial a mis padres: Lidia Camacho y Luis Bautista, también a Angélica Camacho y a Alfonso Balvín, por ayudarme a crecer, confiar en mi en todo momento e impulsarme siempre hacia delante.

Finalmente quiero agradecer los valiosos comentarios realizados por la Dra. Marisol López López, sinodal de esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTAS.....	1
Secuencias Reguladoras	2
Promotores.....	2
Potenciadores.....	3
Regiones de Control de un Dominio (LCR).....	6
Silenciadores.....	7
Delimitadores.....	11
Estructura de la cromatina.....	13
Organización espacial al interior del núcleo.....	16
ANTECEDENTES PARTICULARES.....	18
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS.....	28
REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	29
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	31
pGSil.....	31
pLα^DSil.....	32
pLSilα^DE.....	32
pLα^D(SE).....	32
pLα^D y pLα^DE4.....	33
Deleciones Secuenciales.....	33
CULTIVO CELULAR.....	33
TRANSFECCIONES TRANSITORIAS.....	34
Transfección transitoria de HD3.....	34
Transfección transitoria de eritrocitos de pollo (RBC).....	35

ENSAYOS DE MOBILIDAD ELECTROFORÉTICA RETARDADA.....	36
Preparación de las sondas	36
Preparación y cuantificación de extractos celulares	37
Interacción sonda-extractos nucleares	38
GEL DE PROTEÍNAS.....	38
RESULTADOS	39
AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DEL SILENCIADOR POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	39
DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	40
pGSil	40
pLα^DSil	43
pLSilα^DE	44
pLα^D(SE)	45
pLα^D y pLα^DE4	46
Deleciones Secuenciales	47
TRANSFECCIONES TRANSITORIAS EN ERITROBLASTOS (HD3) Y EN ERITROCITOS DE POLLO DE 10 DÍAS (RBC).....	48
Deleciones Secuenciales	52
INTERACCIONES PROTEÍNA-DNA EN LA REGIÓN DEL SILENCIADOR.....	56
GEL DE PROTEÍNAS.....	59
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DEL SILENCIADOR EN EL PROGRAMA TESS.....	60
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	69
PERSPECTIVAS	71
BIBLIOGRAFÍA	72
APÉNDICE	75

ABSTRACT

Based on the initial α -globin domain silencer regulatory element characterization by Recillas-Targa *et al.*, this work was focused on the functional role of this element. Transient transfections of plasmids carrying different fragments and sub-fragments of the silencer element in erythroblasts and 10 days embryonic erythrocytes demonstrated that silencer effect depends on its differentiation state: in erythroblast, the effect is on the α^D promoter and the enhancer, while in erythrocytes is on the enhancer only. However, the repressor activity was not altered by modifying the position and orientation of the silencer regarding α^D promoter and enhancer. In order to identify functionally relevant silencer regions, transient transfections using sequential deletions constructs were carried out. We found that silencer integrity is essential for its proper activity, hence it would be possible that this element contains positive and negative sequences that act cooperatively regulating gene expression. To determinate if the silencer effect depends on its interaction with nuclear factors it were performed mobility shift assays using silencer sequences SF1, SF2 and SF3 as a labeled probes. The results confirmed the binding of several nuclear factors to the SF1, SF2 and SF3 sites using nuclear extracts from pre-erythroblasts, erythroblasts and 10 day embryonic erythrocytes. Finally the bioinformatic analysis using the TESS program predicts that repressor protein RUNX1 binds SF1 site. Taking into account this relationship, a possible activity of this interaction is proposed. This hypotesis will be tested in the future.

RESUMEN

Partiendo de la caracterización estructural del silenciador del dominio α -globina de pollo que relizaron Recillas-Targa y colaboradores, el presente trabajo tuvo como propósito caracterizar funcionalmente dicho silenciador. Por medio de transfecciones transitorias de plásmidos que contuvieran elementos de regulación del dominio en eritroblastos y en eritrocitos de 10 días de gestación, se determinó que el efecto represor del silenciador depende del estadio de diferenciación eritroide; en eritroblastos, el efecto es sobre el potenciador y el promotor α^D , mientras que en cultivos primarios de 10 días de gestación, el silenciador actúa únicamente sobre el potenciador. Cabe señalar que el efecto represor no se altera al modificar la posición y orientación del silenciador con respecto al promotor y al potenciador. Para identificar en el silenciador regiones con relevancia funcional, se transfectaron deleciones secuenciales del mismo; de acuerdo con los resultados, se observó que la integridad del silenciador es imprescindible para su actividad represora, de ello se infiere que el elemento contiene secuencias con actividades positivas y negativas que actúan de manera cooperativa para regular la expresión génica del dominio. Con el propósito de conocer si la actividad del silenciador depende de su interacción con factores nucleares, se realizaron ensayos de movilidad electroforética retardada utilizando los sitios SF1, SF2 y SF3; se identificaron interacciones proteicas con los tres sitios probados en pre-eritroblastos, eritroblastos y eritrocitos de 10 días. Finalmente el análisis bioinformática en el programa TESS predice que la proteína represora RUNX1 se une al sitio SF1, en función de esta relación se plantea una posible actividad de esta interacción, que será probada en el laboratorio en ensayos ulteriores.

INTRODUCCIÓN

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EUCARIOTES

Las propiedades biológicas que definen a una célula eucariota, como son las interacciones que lleva a cabo con el medio ambiente, la actividad enzimática, la diferenciación celular y su muerte, están determinadas por el tipo y cantidad de proteínas expresadas en ella. A su vez, la síntesis proteica de cada célula, es el resultado de la expresión de un patrón génico (Recillas-Targa y Escamilla-Del-Arenal, 2004).

En general, el proceso por el cual los genes se expresan en el contexto celular, ocurre cuando éstos se transcriben generando moléculas de RNA mensajero (RNAm) que se traducen en proteínas. El proceso está finamente regulado en varios niveles, incluyendo el inicio de la transcripción, el término de la elongación, el procesamiento y transporte del RNA nuclear y la traducción y estabilidad del RNAm (Ogbourne y Antalis, 1998).

Aunque todos estos puntos de control aseguran el correcto funcionamiento de la célula, se considera que la mayoría de eventos de regulación génica ocurren al inicio de la transcripción. El inicio de la transcripción es el proceso que dirige el ensamblaje de la maquinaria transcripcional y, más específicamente, el momento en el que la RNA polimerasa II (RNA pol II) y los factores generales de transcripción se ensamblan sobre el promotor (Ogbourne y Antalis, 1998; Latchman, 2001).

Se han identificado tres niveles que influyen de manera contundente en el control e inicio regulado de la transcripción: 1) las secuencias de DNA, 2) la estructura de la cromatina y 3) la organización del genoma al interior del núcleo. Cada uno de estos niveles permite, de manera regulada, la expresión temporal y tisular de los genes, pero también coopera para desencadenar una rápida respuesta a estímulos celulares externos.

Secuencias reguladoras

Promotores

Un promotor está definido como la secuencia mínima de DNA necesaria para reclutar al complejo de inicio de la transcripción que incluye la RNA pol II y los factores generales de la transcripción. Dicho reclutamiento es responsable de mantener un nivel transcripcional basal (Smale y Kadonaga, 2003). En eucariotas, los promotores contienen secuencias consenso localizadas generalmente entre -40 y 40 pares de bases (pb) relativos al sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias son requeridas para poder iniciar el proceso (Valadez-Graham y Recillas-Targa, 2001; Recillas-Targa y Escamilla-Del-Arenal, 2004).

Una de estas secuencias consenso, denominada caja TATA por su abundancia en adeninas y timinas, suele encontrarse de 25 a 30 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Barberis y Petrascheck, 2003). En un principio se consideraba que la caja TATA era requisito indispensable para designar promotor a una secuencia, sin embargo, a medida que creció el número de promotores estudiados, se encontraron otros elementos que, independientemente de la caja TATA o en conjunto con ella u otros elementos, ejercen la misma función (Smale, 2001). Entre estas secuencias se encuentran los elementos iniciadores (Inr), los elementos de reconocimiento para el factor TFIIB (BRE) y los elementos promotores río abajo (DPE) (Butler y Kadonaga, 2001).

En mamíferos, la diversidad de secuencias consenso parece ser mayor. Considerando que el número de genes que codifican para factores de transcripción es limitado, se sugiere que la amplia gama de combinaciones de secuencias consenso en los promotores generan interacciones selectivas entre factores, dando lugar a innumerables patrones de expresión génica que, a su vez y de manera individual, son altamente específicos (Smale, 2001).

Potenciadores

Los potenciadores (*enhancers*) se identifican como secuencias de DNA cuya interacción con factores proteicos incrementa el nivel de transcripción basal, confiriendo, además, especificidad tisular. Las características fundamentales que definen a los potenciadores es su capacidad para actuar independientemente de su orientación y la distancia (de cientos a varios miles de pb) con respecto al sitio de inicio de la transcripción (Blackwood y Kadonaga, 1998).

Sin embargo y a pesar de la gran cantidad de trabajos de investigación, aún no se esclarecen los mecanismos mediante los cuales los potenciadores ejercen su acción pero, existen evidencias experimentales que aportan datos a favor de dos principales modelos: el modelo progresivo o gradual y el modelo binario o de apagado-encendido (Fig. 1). El modelo progresivo o gradual establece que los potenciadores incrementan la tasa transcripcional, lo que implica que cada una de las células, de forma gradual, incrementa la cantidad de proteína expresada. El modelo binario o de apagado-encendido, en cambio, plantea que un potenciador aumenta la probabilidad de que un promotor se active, de esta forma la mayoría de las células, pero no todas ellas, serán transcripcionalmente activas (Blackwood y Kadonaga, 1998).

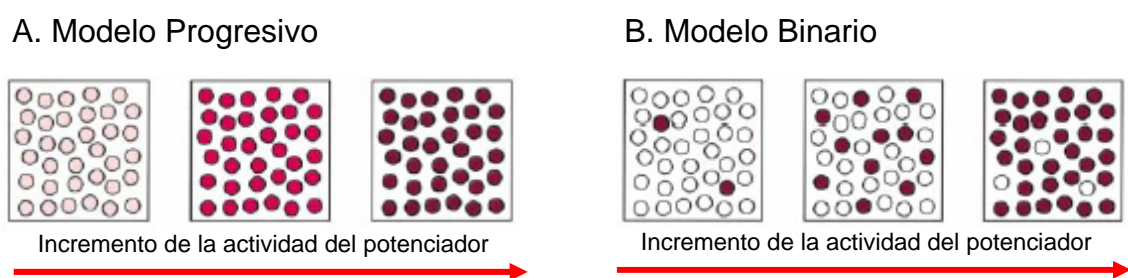


Figura 1. Modelos de la activación transcripcional por potenciadores. (A) Modelo progresivo o gradual. El potenciador activa a los genes uniformemente y el nivel transcripcional es proporcional a la fuerza del potenciador. (B) Modelo binario en donde el potenciador incrementa la probabilidad de transcripción de un gen pero no el nivel transcripcional (Blackwood y Kadonaga, 1998).

A partir de estos modelos, se han propuesto cuatro mecanismos para explicar cómo y bajo qué tipo de interacciones proteicas se establece la señal entre un potenciador y un promotor (Fig. 2).

1. Asa

El modelo de asa (*looping*) se fundamenta en el principio de la activación génica por el reclutamiento de proteínas a secuencias de DNA. Se ha demostrado que este tipo de interacciones promueve el remodelamiento de una cromatina represiva hacia una cromatina transcripcionalmente activa y, además, en algunos casos se atrae a la maquinaria transcripcional basal formando un complejo estable (Bulger y Groudine, 1999).

En este modelo la interacción física entre el potenciador y el promotor es crítica para iniciar la transcripción, y se lleva a cabo cuando proteínas unidas (linealmente distantes) a cada una de estas secuencias interactúan acercando a ambos elementos reguladores, dando lugar a una estructura de asa (Bulger y Groudine, 1999).

2. Encarrilamiento

En el modelo de encarrilamiento (*tracking*) el potenciador recluta una serie de proteínas de unión a DNA y coactivadores asociados. Este complejo se ancla a una zona específica de la cromatina: el potenciador, formando un complejo que se desplaza a lo largo del DNA hasta contactar al promotor correspondiente (Blackwood y Kadonaga, 1998).

En conjunto con la actividad de algunos coactivadores del complejo, la estructura represiva de la cromatina se remodela, lo que facilita la unión de la maquinaria basal transcripcional en el promotor del gen a ser activado (Blackwood y Kadonaga, 1998).

3. Relevo

El modelo de relevo (*linking*) propone que la comunicación entre un promotor y un potenciador es mediada por una cadena de proteínas unidas a lo largo de la fibra de cromatina, interactuando o no con el DNA, que transmiten la señal potenciadora hasta el promotor (Bulger y Groudine, 1999).

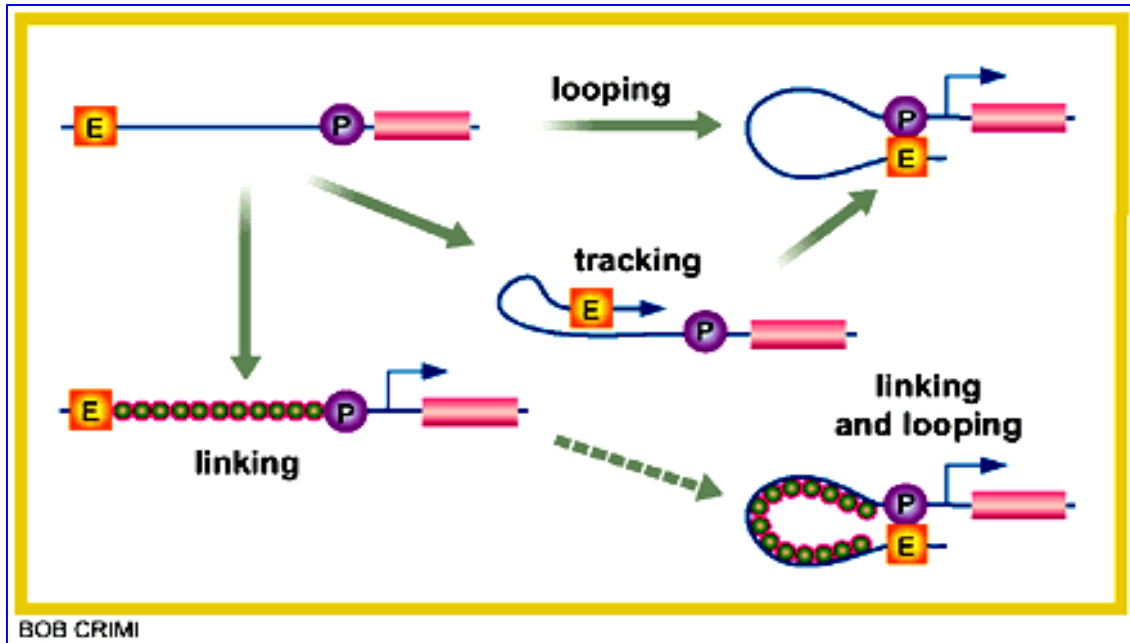


Figura 2. Mecanismos para la activación transcripcional por un *potenciador*. *Looping:* el incremento en la expresión de un gen se logra por la interacción física entre un potenciador y su promotor. *Tracking:* Se encarrilan factores de transcripción en la zona del potenciador para después desplazarse a lo largo de la cromatina. *Linking:* la interacción potenciador-promotor se logra a través de una cadena proteica donde la señal se transmite a manera de relevo (Bulger y Groudine, 2002).

4. Transcritos Intergénicos

Finalmente se propone que la transcripción intergénica, es decir, de RNAs no codificantes, está involucrada en la formación de un asa estable entre un potenciador y su promotor específico (Li et al., 2004). En este modelo, proteínas activadoras, modificadores de la cromatina y el complejo de pre-iniciación (PIC) son reclutados, en orden génico-específico, al promotor y al potenciador, lo que conduce a una apertura local de la cromatina. Posteriormente, se inicia la transcripción intergénica en el potenciador

provocando que el complejo de elongación, asociado con modificadores de cromatina, se anclen a una región específica de DNA y traigan como consecuencia una alteración mayor de la estructura de la cromatina. Una vez que la cromatina se abre, el complejo proteico conducido por el potenciador puede establecer contacto con el promotor, formando la estructura de asa entre ambos elementos (Li et al., 2004).

Cabe señalar que en ciertos casos estos modelos no son excluyentes y que pueden existir combinaciones, que de manera regulada y altamente específica, activen o repriman la expresión de un gen o grupo de genes.

Región de control de un dominio (LCR)

Las regiones de control de un dominio o LCRs se han definido como un conjunto de secuencias de DNA capaces de dirigir, a altos niveles, la expresión tejido-específica de los genes contenidos en un dominio (Bulger y Groudine, 1999).

Los LCRs difieren de los potenciadores en que los primeros parecen contribuir a la apertura de la cromatina, evitando que señales transcripcionalmente negativas afecten la expresión regulada de los genes, lo que no sucede con los potenciadores (Bulger y Groudine, 1999; Valadez-Graham y Recillas-Targa, 2001).

Silenciadores

A diferencia de los elementos reguladores anteriores, la definición de los silenciadores se ha ido modificando. En un principio, de manera análoga a la definición de los potenciadores, se definieron como secuencias de DNA capaces de reprimir la actividad transcripcional de manera independiente de su orientación y posición. Sin embargo, a medida que aumentó la caracterización de elementos reguladores negativos, se observó que la posición y/o la orientación de varios de ellos es determinante para su adecuada actividad (Ogbourne y Antalis, 1998).

La definición que propone Ogbourne y Antalis (1998), define a un silenciador como secuencia específica de DNA localizada río arriba de un promotor que afecta negativamente la transcripción. No obstante, se han descrito silenciadores río abajo de su promotor, como los silenciadores del dominio α -globina de pollo, del gen *interleucina 4* y del gen *CD4* (Recillas-Targa et al., 1993; Ansel et al., 2004).

Por lo anterior, secuencias de DNA que, en ensayos de transfecciones transitorias disminuyan la actividad de un promotor o un potenciador, son consideradas silenciadores.

La amplia gama de silenciadores con características diferentes complican el planteamiento de mecanismos que se adecuen a todos ellos. Ogbourne y Antalis (1998), en un intento por simplificar la problemática, han propuesto dividir los silenciadores en aquellos cuya actividad represiva se ejerce independiente de la posición; silenciadores clásicos, y aquellos que dependen de la posición; elementos reguladores negativos (NRE). El mecanismo funcional de los silenciadores clásicos es activo; recluta elementos de la maquinaria transcripcional basal interfiriendo con el ensamblaje de la RNA pol II en el promotor. El mecanismo de los NRE, por el contrario, es pasivo; se une a proteínas represoras inhibiendo físicamente la interacción de factores de transcripción (FTs) con sus sitios de unión al DNA, o bien, interfiriendo con señales positivas de la transcripción (Ogbourne y Antalis, 1998).

Los elementos de regulación negativa pueden encontrarse en intrones, exones y en la región 3' no traducida de transcritos maduros (Ogbourne y Antalis, 1998). Para ejercer un efecto represor sobre la transcripción, algunos silenciadores requieren de un promotor específico o bien localizarse en cierta posición y orientación respecto al promotor blanco u otros elementos de regulación. No obstante, se han descrito silenciadores más flexibles, cuya actividad no está sujeta a su localización dentro de un dominio.

Por ello, no resulta sorprendente que los silenciadores intervengan en distintos niveles de regulación genética, como en la modificación de la estructura de la cromatina, en el proceso de corte y empalme de intrones (*splicing*), en la poliadenilación y en el ensamblaje de la maquinaria basal transcripcional (Ogbourne y Antalis, 1998).

Pese al aumento significativo en la identificación de silenciadores en diferentes sistemas biológicos, pocos grupos de investigación han progresado lo suficiente para plantear modelos que involucren mecanismos consistentes. Es por ello que el objetivo del presente trabajo de investigación se enfoca en la caracterización funcional de un elemento de regulación negativo: el silenciador del dominio α -globina de pollo. Esta caracterización contribuirá a comprender la participación de los silenciadores sobre la represión específica y diferencial de los genes al interior de un dominio.

Ejemplos de silenciadores:

Entre los modelos mejor estudiados se encuentra el de los genes *HMRa* y *HML α* de los alelos *mating type* de *Saccharomyces cerevisiae*. La actividad de dichos silenciadores es independiente de la orientación y de la posición, lo cual sugiere que el estado de represión emana bidireccionalmente y, de alguna forma, es propagado a lo largo del DNA (Kamakaka, 1997). El modelo propone que el silenciamiento se establece a partir de la unión covalente entre proteínas represoras y el elemento silenciador. La interacción conduce al *locus* genético a la formación y expansión de cromatina represiva, después de lo cual, las

proteínas que cooperaron en establecer el estado silenciado de los genes, dejan de ser indispensables (Loo y Rine, 1995). Cabe señalar que el mismo modelo se propone para el silenciador del gen que codifica para la proteína *interleucina 4* y para el silenciador del gen *CD4* de mamíferos (Ansel et al., 2004).

Otro ejemplo que vincula el silenciamiento con la estructura de la cromatina, corresponde al silenciador presente en el intrón 1 del factor regulador miogénico *myf5* del pez cebra. El silenciador consiste de dos módulos separados por 156 pb. Cuando la zona de 156 pb es seccionada se suprime la represión, de manera interesante, al cambiar la secuencia intermedia por una secuencia de DNA irrelevante proveniente de otro fragmento la actividad se reestablece. A partir de este resultado, que demuestra que la actividad represiva de los dos módulos silenciadores es dependiente del espacio entre ellos, se sugiere que la estructura cromosómica alrededor del intrón 1 es un factor determinante en la represión del gen *myf-5* del pez cebra (Lin et al., 2004).

Otro silenciador intrónico que llama la atención, es el silenciador del gen neuronal motor de supervivencia 1 (*SMN1*) de vertebrados. Este elemento consiste de una sola base, que es reconocida específicamente por el represor hnRNP A, el cual evita la unión del complejo que lleva a cabo el proceso de corte y empalme de intrones (*splicing*). Este ejemplo ilustra perfectamente la complejidad de la regulación genética en la cual intervienen los silenciadores (Kashima y Manley, 2003).

A la fecha, el modelo que mejor explica un mecanismo de silenciamiento es el que involucra al silenciador de 23 pb NRSE (*Neuron Restrictive Silencer Element*) y a su proteína de unión REST/NRSF, los cuales silencian un gran número de genes neuronales. En las neuronas existe una baja o nula concentración del represor REST/NRSF, por lo tanto, es improbable que la interacción entre el represor y su silenciador se lleve a cabo. Sin embargo, en células no neuronales, donde existen altas concentraciones del factor REST/NRSF, la probabilidad de que se presente la interacción silenciador-represor se incrementa. Dicha asociación atrae diversos cofactores celulares

incluyendo a CoREST, mSin3A y enzimas desacetilasas de histonas, lo que conduce a la compactación de la cromatina y, por lo tanto, a la represión del dominio en células no-neuronales (Zuccato et al., 2003; Fuller et al., 2005).

Recientemente se han identificado secuencias de DNA que incrementan la expresión génica, a condición de estar presente un silenciador. A este tipo de secuencias reguladoras se les denomina elementos anti-silenciadores (ASE). Un ASE lo comparten los genes Rag1 y Rag2, los cuales codifican para las proteínas RAG1 y RAG2 que dirigen el ensamblaje de los genes receptores de antígenos en timocitos. Este ASE comparte algunas características con los LCRs, dado que abate el efecto de posición y confiere especificidad tisular (Yannoutsos et al., 2004).

El otro sistema donde un ASE fue identificado es en el gen de vimentina de humano. El silenciador se une a la proteína ZBP-89, mientras que el ASE interactúa con Stat3. La interacción entre ambas proteínas se demostró por ensayos de co-inmunoprecipitación y estos datos permitieron sugerir un modelo en el que la actividad represiva se establece cuando ZBP-89 secuestra a Sp1, factor importante para la formación y estabilización de la maquinaria basal transcripcional. La interacción entre las proteínas de unión al silenciador y al ASE, evita que ZBP-89 establezca contacto con Sp1, permitiendo que se asocie al complejo transcripcional y se reestablezca la actividad génica (Wu et al., 2004).

Es importante mencionar que aunque un fragmento de DNA sea clasificado, en un principio, como silenciador, potenciador o cualquier otro elemento de regulación, no es sino hasta llevar a cabo un conjunto de estrategias experimentales como esta aseveración puede confirmarse. Como muestra de esta situación se reporta una secuencia en la región distal del gen β -lactoglobulina que se caracterizó, por transfecciones transitorias, como un silenciador, sin embargo, en el contexto endógeno, donde otras secuencias reguladoras están presentes, el elemento actúa reclutando enzimas con actividad de acetilasas de histonas, estableciendo condiciones permisivas para la transcripción genética (Reichenstein et al., 2005). El elemento de regulación

del dominio α -globina de pollo abordado en esta tesis ha sido clasificado como un silenciador a partir de ensayos de transfecciones transitorias (Recillas-Targa et al., 1993), sin embargo, dados los argumentos expuestos anteriormente, no se descarta la posibilidad de que la secuencia en estudio posea características diferentes a las de un silenciador.

Dado que en los últimos años el aumento de la descripción de silenciadores en diversos sistemas génicos es notable, se deduce, a partir de la información colectada en la literatura, que el papel de los silenciadores es fundamental en la represión de un amplio número de genes que participan en el desarrollo y especialización tisular.

Delimitadores

Tanto los potenciadores como algunos silenciadores regulan la transcripción encontrándose a distancias considerables de sus genes blanco (Ogbourne y Antalis, 1998). Esta característica implica entonces, que genes estructuralmente cercanos a diversos elementos de regulación, sean susceptibles a la influencia positiva, negativa e inespecífica de los mismos. En las últimas décadas, se ha identificado un nuevo tipo de secuencias de DNA denominadas delimitadores (*insulators*), capaces de delimitar dominios génicos evitando la influencia de señales adyacentes (Kuhn y Geyer, 2003; Capelson y Corces, 2004; Kimura y Horikoshi, 2004; Brasslet y Vaury, 2005).

Los delimitadores poseen dos propiedades funcionales: 1) al localizarse exclusivamente entre un potenciador o silenciador y un promotor, bloquean la comunicación entre ellos (actividad de bloqueo) y, 2) protegen a un transgen, es decir, un gen exógeno de los efectos de posición causados por los distintos entornos de cromatina, presentes en el sitio de integración al genoma (efecto de posición) (Fig. 3; Kuhn y Geyer, 2003; Capelson y Corces, 2004; Kimura y Horikoshi, 2004; Brasslet y Vaury, 2005).

A diferencia de los potenciadores y los silenciadores, la función de los delimitadores, al interior del dominio, es neutra; ello resulta relevante, pues la formación de regiones génicas autónomas podría constituir un nivel de

regulación primario, sin el cual la regulación transcripcional, ya sea positiva (potenciadores) o negativa (silenciadores), sería altamente improbable (Capelson y Corces, 2004; Valadez-Graham y Recillas-Targa, 2001).

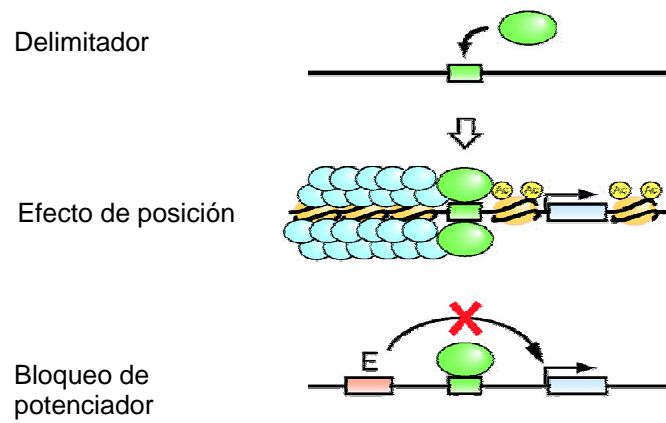


Figura 3. Propiedades de los delimitadores. Protegen a un transgen de los efectos de posición y bloquean la comunicación entre un potenciador y su promotor (Kimura y Horikoshi, 2004).

Estructura de la cromatina

Las células eucariotas son células cuyas funciones biológicas se llevan a cabo en organelos especializados. Uno de estos, el núcleo, contiene la información genética de la célula codificada en moléculas de DNA. El DNA interactúa con proteínas nucleares formando el complejo denominado cromatina, el cual permite la compactación del genoma y, además, constituye un nivel en el control de la expresión génica (Geyer y Parnell, 2001; Recillas-Targa y Escamilla-Del-Arenal, 2004).

La unidad mínima de la cromatina es el nucleosoma, el cual consiste de un octámero de proteínas histonas (2 copias de cada una de 4 histonas: H2A, H2B, H3 y H4) al cual se le asocian 147 pb de DNA (Geyer y Parnell, 2001; Felsenfeld y Groudine, 2003; Recillas-Targa y Escamilla-Del-Arenal, 2004; Bernstein y Allis, 2005). Cada nucleosoma está separado del otro por un segmento de DNA de 40 a 60 pb, donde se incorpora una quinta histona, la histona H1. La histona H1 contribuye a la formación de un nivel superior de compactación de la cromatina; una fibra compacta con un diámetro de alrededor de 30 nm conocida también como solenoide. El solenoide continúa estructurándose hasta llegar, durante la mitosis, al grado más alto de compactación; los cromosomas metafásicos (Fig. 4; Geyer y Parnell, 2001; Felsenfeld y Groudine, 2003).

La cromatina no es uniforme respecto a la distribución de genes y a la actividad transcripcional. Existen regiones de cromatina compacta conocida como heterocromatina, la cual es inaccesible a factores proteicos que regulan procesos bioquímicos como el de la transcripción. Es por ello que la heterocromatina se relaciona con el silenciamiento génico. Las zonas más laxas del genoma son conocidas como eucromatina; en ellas están presentes diferentes factores proteicos que regulan la transcripción. Cada tipo celular tiene sus genes en un único patrón de eucromatina y heterocromatina, dicho patrón es flexible y cambia durante el ciclo celular, sin embargo, después de la fase S se mantiene, asegurando que las características particulares de cada

linaje sean transferidas de generación en generación (Orphanides y Reinberg, 2002).

La forma en la que la estructura de la cromatina es regulada, incluye un amplio espectro de modificaciones covalentes como la acetilación, la fosforilación, la metilación y la ubiquitinación. En este proceso los residuos aminoacídicos de las histonas, que conforman a los nucleosomas, son el principal blanco. La complejidad de dichas modificaciones se multiplica, además, por la existencia de variantes de histonas en numerosos organismos que dan a la célula la oportunidad de intercambiar la composición del nucleosoma y, por ende, su potencial respecto a las modificaciones covalentes (Bernstein y Allis, 2005).

También se ha demostrado que existe una relación entre transcritos intergénicos (no-codificantes) y la formación de dominios de cromatina especializados involucrados en varios procesos como son: 1) la compensación de dosis génica en moscas y mamíferos y 2) la impronta y el silenciamiento génico en una gran variedad de organismos (Bernstein y Allis, 2005).

Es importante recalcar que cada uno de los aspectos anteriormente mencionados contribuye tanto a la activación como a la represión génica, promoviendo interacciones específicas entre secuencias distales, así como exponiendo u ocluyendo sitios de unión a reguladores transcripcionales (Felsenfeld y Groudine, 2003).

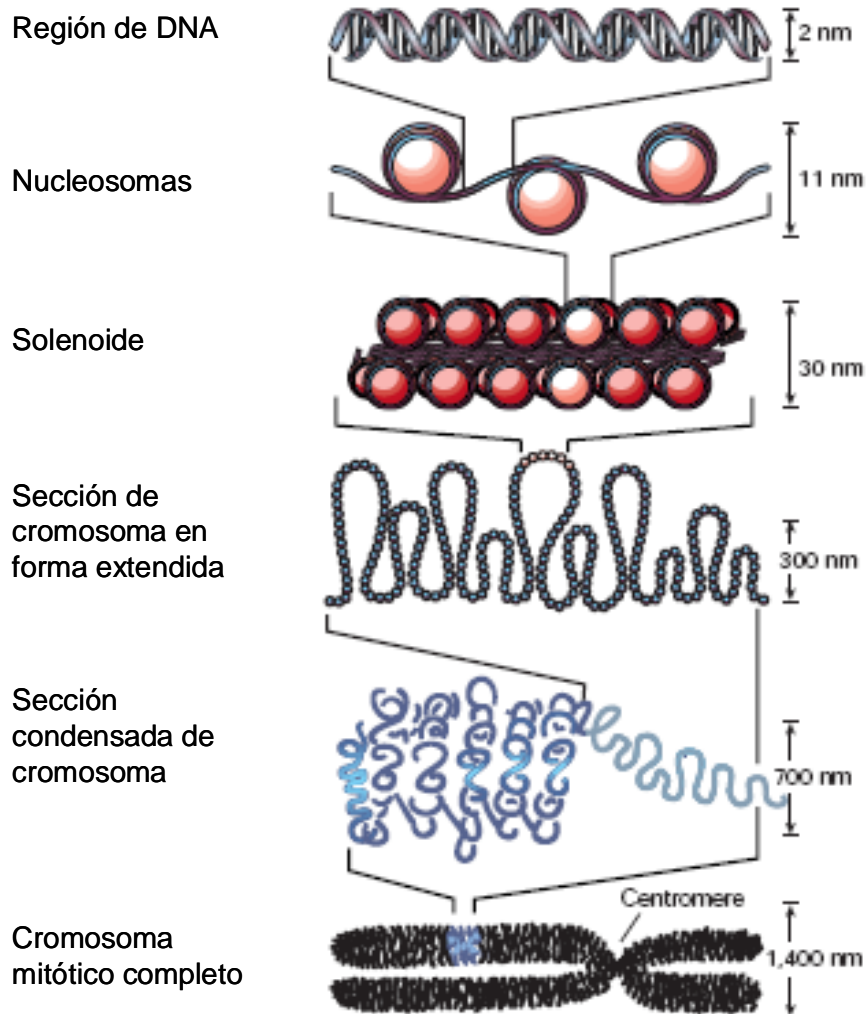


Figura 4. Niveles de compactación del DNA. El nivel de organización fundamental es el nucleosoma. Los nucleosmas se mantienen unidos por un pequeño segmento de DNA. El siguiente nivel de organización es la fibra de 30 nm de diámetro o solenoide formada por la compactación de nucleosomas. La organización del genoma a partir de este punto sigue siendo incierta (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Organización espacial al interior del núcleo

Para responder a la pregunta de cómo se establecen y mantienen diferentes patrones de expresión génica en un gran número de tipos celulares asegurando el desarrollo y correcto funcionamiento de organismos multicelulares, se necesita comprender cómo se organiza el genoma al interior del núcleo (Cremer y Cremer, 2001; Kosak y Groudine, 2004).

A partir del desarrollo de la hibridación *in situ* con el uso de sondas fluorescentes (FISH) ha sido posible avanzar en la comprensión de la estructura génica al interior del núcleo. La técnica de FISH ha permitido observar que la cromatina transcripcionalmente activa no se encuentra distribuida aleatoriamente al interior del núcleo, sino que se localiza en zonas específicas que han sido denominadas recientemente territorios cromosómicos (CT) (Fig. 5). Esta organización nuclear influye en la expresión génica, pues depende de la localización territorial de un gen el que este pueda o no acceder a la maquinaria transcripcional (Cremer y Cremer, 2001; Kosak y Groudine, 2004).

El modelo de territorios cromosómicos-compartimientos intercromatina (CT-CI), favorece la participación del núcleo en la regulación de la expresión génica. Este modelo establece que los cromosomas ocupan espacios discretos dentro del núcleo: CT's, separados por canales llamados compartimientos intercromosómicos (CI). En los CI se encuentran los factores proteicos que participan en la transcripción. De esta forma, los genes activos son conducidos a zonas colindantes con los CI, es decir, en la periferia de los CT's, mientras que los genes que permanecen silenciados durante largos periodos, se localizan en la cromatina compacta lejos de los CI (Fig. 5; Cremer y Cremer, 2001; Kosak y Groudine, 2004).

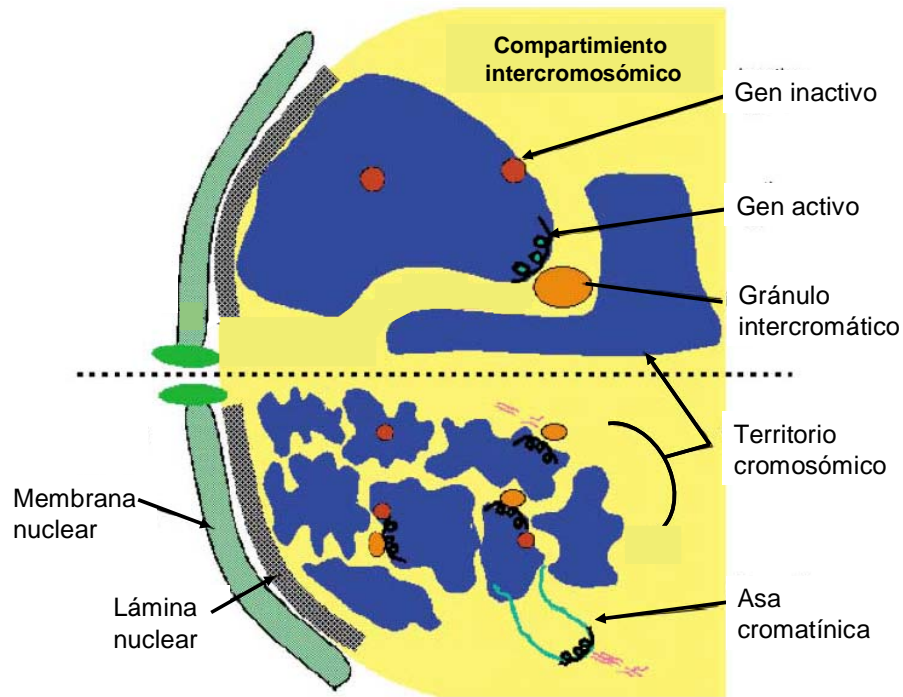


Figura 5. Modelo de territorios cromosómicos-compartimientos intercromatínicos (CT-CI). En azul se muestran los territorios cromosómicos, en la periferia de estos a los dominios génicos transcripcionalmente activos. En rojo se señalan a los genes inactivos, generalmente, reclutados en sitios alejados de los compartimientos intercromosómicos (Kosak y Groudine, 2004).

En resumen y con base en los antecedentes hasta aquí expuestos, resulta claro que la regulación temporal y espacial de los genes eucariotas al inicio de la transcripción se efectúa en varios niveles: 1) secuencias reguladoras de DNA, 2) estructura de la cromatina y 3) organización del genoma al interior del núcleo, el estudio profundo de cada uno de ellos es fundamental para entender la regulación genética (Recillas-Targa y Escamilla-Del-Arenal, 2004).

Tanto la regulación positiva como la regulación negativa de los genes, son necesarias para su expresión diferencial, no obstante, la información sobre las secuencias silenciadoras es escasa, por ello nuestro objetivo es caracterizar funcionalmente un silenciador, el silenciador del dominio α -globina de pollo, y contribuir así a la comprensión del mecanismo que regula negativamente al grupo de genes presentes en este dominio durante el desarrollo eritroide.

ANTECEDENTES PARTICULARES

En el laboratorio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (IFC) dirigido por el Dr. Félix Recillas Targa, nos interesamos en el estudio de la relación y efecto de la estructuración del genoma en cromatina sobre la regulación diferencial de la expresión génica. En este contexto y para abordar ciertas preguntas vinculadas a esta relación y sus efectos, hemos adoptado el grupo de genes α - y β -globina de pollo como modelo de sistema biológico (Fig. 6 y 7).

Desde hace algunas décadas varios grupos de investigación se han dado a la tarea de describir y caracterizar a los dominios α y β -globina de pollo. Actualmente se sabe que estos dominios contienen múltiples secuencias reguladoras que, en conjunto con las modificaciones sobre la cromatina, dictan la expresión regulada de los genes contenidos en ellos. Se espera que entender la contribución de cada uno de estos elementos en la regulación génica permita ampliar y profundizar en la comprensión del mecanismo durante el desarrollo eritroide.

En este contexto se ha demostrado que durante el desarrollo embrionario y hasta el nacimiento del pollo, el aporte de oxígeno de los eritrocitos a los diferentes tejidos va cambiando. El proceso depende del tipo de proteínas codificadas por los dominios α y β -globina de pollo; estas proteínas se expresan de manera diferencial a lo largo del desarrollo embrionario (Bruns e Ingram, 1973).

El dominio β -globina de pollo abarca alrededor de 33 kb. Contiene un gen embrionario ε , un gen fetal ρ y dos genes adultos, β^A y β^H , los cuales se expresan de acuerdo al estadio de diferenciación eritroide. Entre los elementos de regulación que presenta el dominio se encuentra una región de control del *locus* (LCR) y un potenciador eritroide-específico (β^A/ε) que regula la transcripción de los genes β^A y ε (Fig. 6). Foley y Engel propusieron en 1992 que ambos promotores (β^A y ε) compiten por el potenciador que comparten; dicha preferencia está dada por los factores proteicos presentes en los

promotores individuales en cada estadio de diferenciación eritroide. El modelo anterior pone de manifiesto que los factores estadio-específicos contribuyen de manera importante en la regulación de la expresión génica del dominio β -globina de pollo (Foley y Engel, 1992).

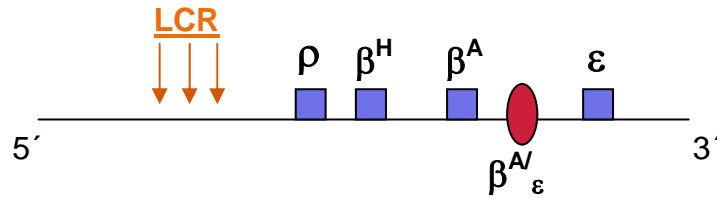


Figura 6. Dominio β -globina de pollo. Contiene cuatro genes: un gen embrionario ϵ , un gen fetal ρ y dos genes adultos β^A y β^H . Río arriba de los genes se encuentra la región de control del *locus* (LCR) y, entre el gen embrionario ϵ y el gen adulto β^A , está el *potenciador* β^A/ϵ (Recillas-Targa, 2000).

Por otra parte, el dominio α -globina de pollo abarca una región genómica de 40 kb y contiene tres genes; un gen embrionario π y dos adultos α^A y α^D (Fig. 7).

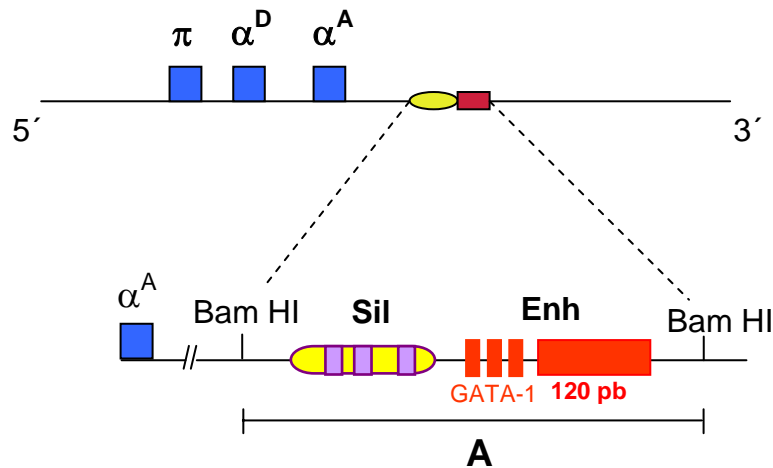


Figura 7. Dominio α -globina de pollo. En la parte superior se muestran los genes globina: π , el gen embrionario, α^D y α^A , los genes adultos. Río abajo del gen α^A , dentro de la región de 1 kb, denominada con la letra A, se encuentra el silenciador en amarillo con los sitios SF1, SF2 y SF3 en morado. El potenciador está compuesto por tres secuencias de unión al factor eritroide específico GATA-1 (rectángulos verticales rojos) y la denominada caja de 120 pb (rectángulo horizontal rojo) (Recillas-Targa et al., 1993).

En 1993 Recillas-Targa y colaboradores, compararon la similitud entre las secuencias de la región de 1 kb (segmento A de las figuras 7 y 8) localizadas en el costado 3' del gen α^A del dominio α -globina del pollo y del pato. El resultado del alineamiento entre las secuencias permitió identificar tres sitios de reconocimiento para el factor eritroide GATA-1 y una región de 120 pb altamente conservada. Este dato sugirió que la participación de dichas secuencias en la regulación del dominio podría ser significativa (Recillas-Targa et al., 1993).

Por medio de transfecciones transitorias en eritroblastos de pollo de plásmidos con deleciones secuenciales del segmento A, fueron identificados adyacentemente dos elementos de regulación: un silenciador y un potenciador (Fig. 7).

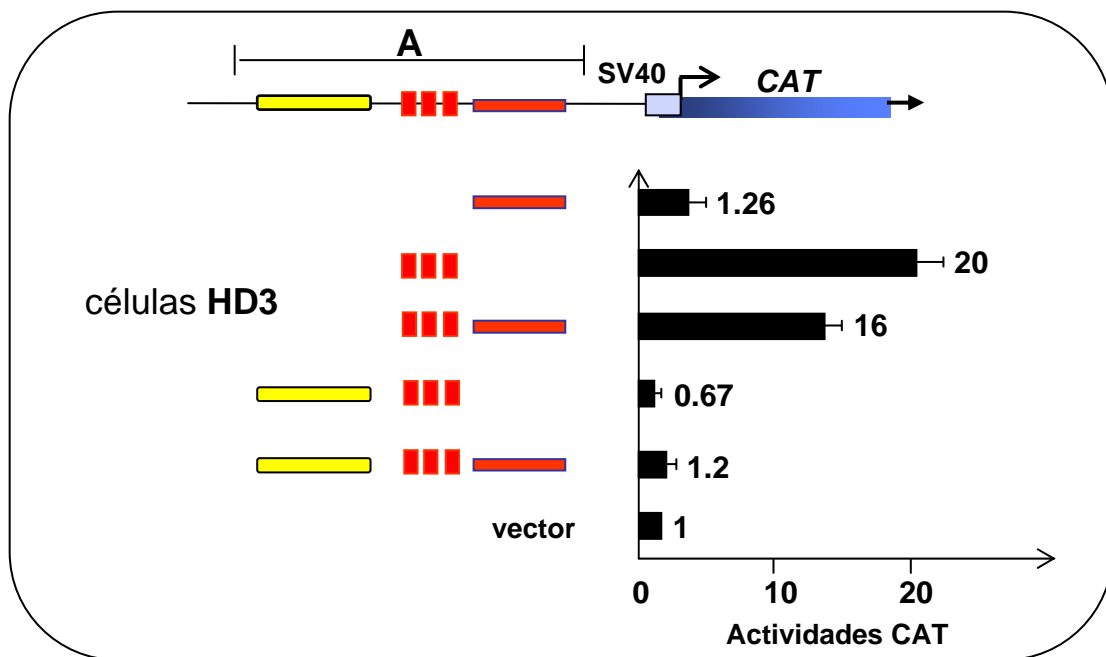


Figura 8. Identificación de elementos de regulación del dominio α -globina de pollo por medio de transfecciones transitorias en eritroblastos de pollo (HD3). Se utilizó como reportero al gen *CAT* el cual codifica para la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa y al promotor viral SV40. El silenciador está representado por el rectángulo amarillo. Los tres sitios de unión al factor eritroide GATA-1 se representan como tres pequeños rectángulos verticales, mientras que la caja de 120 pb del potenciador se muestra como un rectángulo horizontal rojo. Los elementos de regulación están incluidos dentro de una región de DNA de 1 kb identificada con la letra A (Recillas-Targa et al., 1993).

El potenciador, compuesto por los tres sitios de unión al factor eritroide GATA-1 y la región de 120 pb, actualmente se estudia a detalle en nuestro laboratorio (Rincón-Arano et al., 2005). Sin embargo, para comprender cómo se modifican, de manera regulada los niveles de expresión de los genes α -globina a lo largo de la diferenciación eritroide, es indispensable considerar la influencia negativa del elemento regulador identificado como silenciador. Es por ello que el presente trabajo de investigación se abocará, desde este momento, al estudio del mismo.

Después de postular la existencia de un silenciador en el dominio α -globina de pollo, Recillas-Targa y colaboradores decidieron identificar sitios de unión al DNA por parte de factores nucleares dentro del elemento negativo. Para ello realizaron un ensayo *in vitro* de protección a la DNasa I (*DNase I footprinting*), dicho ensayo consiste en marcar la zona de interés radioactivamente y someterla al corte por la enzima DNasa I. Con ello se esperaba encontrar la existencia de proteínas interactuando con el silenciador. En caso de presentarse dicha interacción, estas protegerían esa región del corte enzimático. Los resultados evidenciaron que dentro del silenciador existen al menos tres zonas de protección: SF1, SF2 y SF3 (Fig. 9). Las siglas SF corresponden a *Silencer Factor*.

Cabe señalar que las secuencias de cada una de las zonas de protección mencionadas parecen no tener una clara similitud con sitios de unión a factores nucleares conocidos.

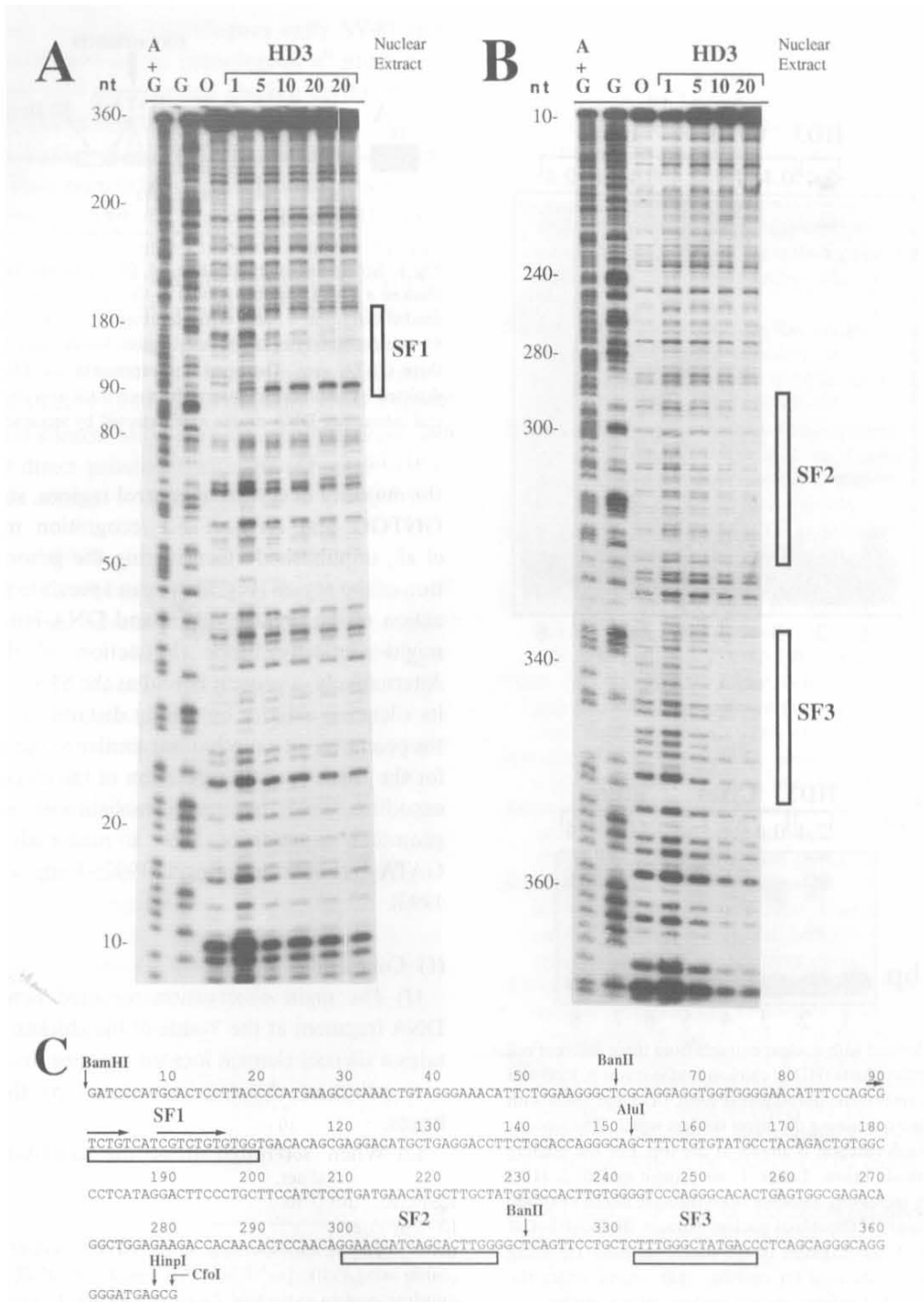


Figura 9. Ensayo de protección a la DNasa I. El carril A+G y el G corresponden a la secuenciación del silenciador por la reacción de Maxam and Gilbert. El ensayo se llevó a cabo con concentraciones crecientes de extractos nucleares. (A) Hebra 5' → 3' del silenciador, (B) hebra 3' → 5' y (C) muestra la región de 370 pb del silenciador (*BamHI-CfoI*). Las regiones de protección están subrayadas con rectángulos (Recillas-Targa et al., 1993).

Con el fin de asociar la actividad del silenciador a la presencia de factores proteicos estadio-específicos, se hicieron ensayos de retardo o de movilidad

electroforética retardada (*Band Shift Assay*) utilizando extractos nucleares de eritroblastos (HD3) y de eritrocitos maduros. Como sonda se utilizó la región SF1 del silenciador (Fig. 9A y Fig. 10A).

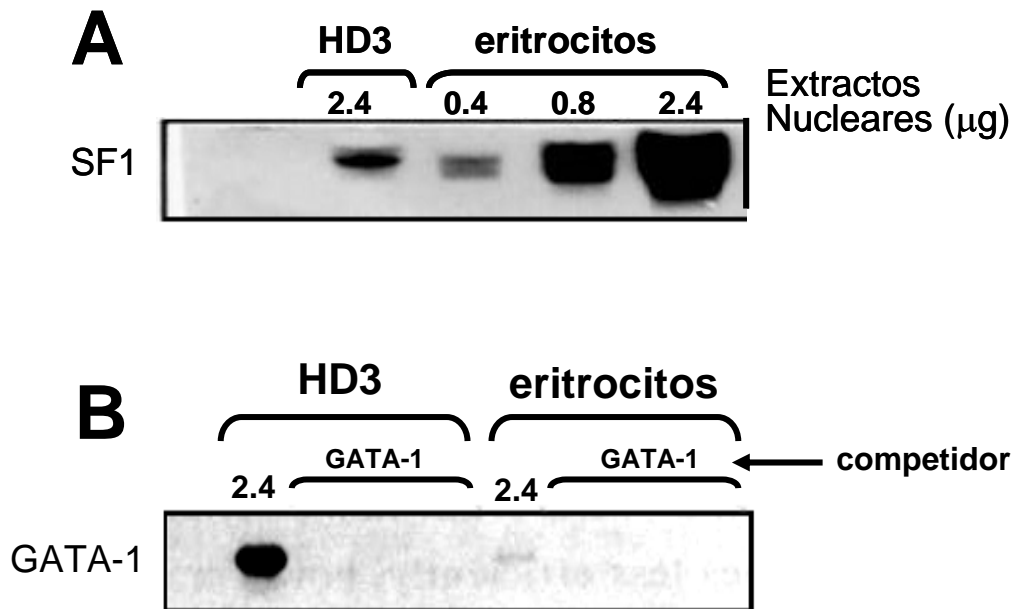


Figura 10. Ensayo de movilidad electroforética retardada. El esquema muestra los complejos proteicos formados por la incubación de extractos nucleares de eritroblastos (HD3) y eritrocitos maduros de pollo con sondas de elementos de regulación del dominio α -globina de pollo. (A) Ensayo de retardo con la sonda SF1 del silenciador. (B) Ensayo de retardo con la sonda GATA-1 del *potenciador*. Las cantidades de extractos nucleares usadas se muestran en la parte superior (Recillas-Targa et al., 1993).

Los resultados muestran que las proteínas que reconocen a la región SF1 son más abundantes en extractos nucleares de eritrocitos terminalmente diferenciados que en extractos nucleares de eritroblastos (Fig. 10A). Por el contrario, al utilizar una sonda correspondiente al sitio de unión GATA-1 presente en la región de 120 pb del *potenciador*, se encontró una mayor abundancia de factores proteicos en extractos de eritroblastos que en extractos de eritrocitos (Fig. 10B).

Tomando en cuenta que la transcripción de los genes α -globina en eritrocitos maduros de pollo es prácticamente nula, se puede especular acerca de la

participación del silenciador en la represión de dichos genes en estadios de diferenciación terminal (Recillas-Targa et al., 1993).

Por otra parte, cabe señalar que los ensayos descritos hasta el momento, no toman en cuenta la influencia de la estructura de la cromatina. Con el fin de analizar si la actividad del silenciador se afecta por los cambios en la organización cromatínica, se realizó en el laboratorio un ensayo de accesibilidad *in situ* a enzimas de restricción (*Restriction Endonuclease Hypersensitivity Assay*) en la región del silenciador (Escamilla-Del-Arenal y Recillas-Targa, datos no publicados). Este tipo de ensayo se basa en el acceso diferencial de enzimas de restricción a su sitio blanco en el contexto de la cromatina. Cuando la región de interés está muy compactada, la enzima de restricción no reconoce su sitio de corte, por el contrario, si la cromatina está descompactada, la enzima corta la región (Mymryk et al., 1997).

En el presente ensayo, la banda de 777 pb indica la digestión con la enzima *Dra III*, que localiza su sitio de corte en medio del silenciador (Fig. 11). En la figura se observa un cambio en la intensidad de la banda de 777 pb entre los extractos nucleares de la línea celular HD3 y los extractos de eritrocitos de 10 días de gestación (Eri-10). Lo anterior implica que, entre estos dos estadios de diferenciación, la organización local de la cromatina en el silenciador se va volviendo permisiva.

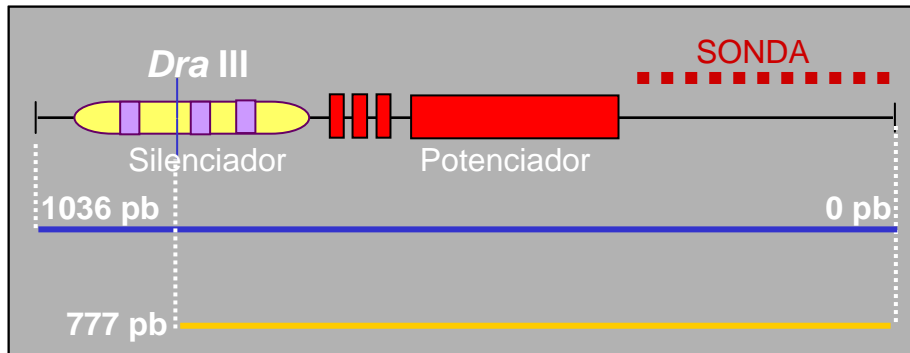
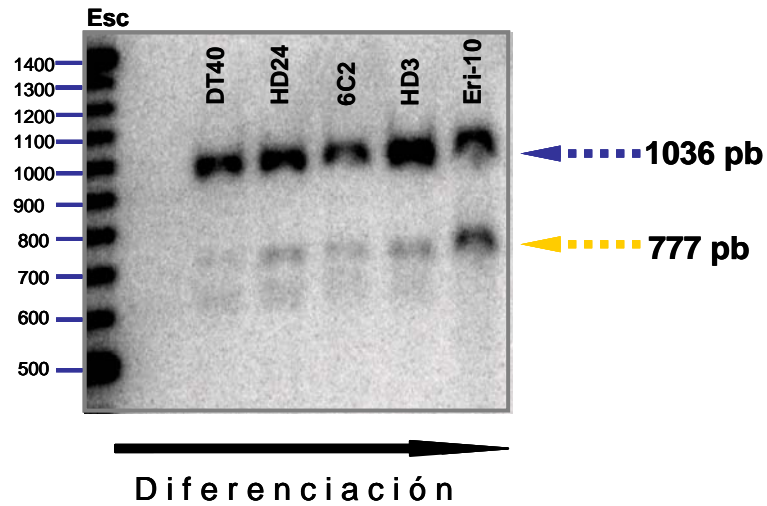
A**B**

Figura 11. Ensayo de accesibilidad *in situ* a enzimas de restricción en la región del silenciador. (A) El ensayo se realizó utilizando la enzima de restricción *Dra III* que corta al silenciador en una región intermedia. Con una línea azul se muestra la región de 1 kb que contiene al silenciador y al potenciador. En amarillo se representa el tamaño del segmento resultante de la digestión con la enzima *Dra III*. (B) Gel de acrilamida donde se observa el incremento de la intensidad de banda de 777 pb entre los extractos nucleares de eritroblastos (HD3) y eritrocitos de 10 días (Escamilla-Del-Arenal y Recillas-Targa, datos no publicados).

Considerando los datos presentados anteriormente y que este es el único modelo descrito en la literatura en el cual un silenciador y un potenciador se encuentran adyacentes, se sugiere como una hipótesis atractiva la alternancia en la función de ambos elementos reguladores a través de la diferenciación eritroide, donde el silenciador sería activo en etapas tardías de diferenciación.

Sin embargo, aún no existen datos sobre la participación funcional del silenciador al interior del dominio α -globina que avalen la propuesta anterior, por lo que hemos considerado necesario llevar a cabo la caracterización funcional del elemento negativo conociendo su relación con el potenciador y los promotores endógenos del dominio. Así mismo, nos proponemos identificar las secuencias de DNA que rigen la actividad del silenciador, tomando en consideración distintas etapas de la diferenciación eritroide.

La información sobre el silenciador que resulte de este trabajo de investigación contribuirá al planteamiento de modelos de mecanismos de regulación que expliquen la expresión diferencial de los genes α -globina, en diferentes estadios de diferenciación eritroide.

HIPÓTESIS

La actividad funcional del silenciador localizado en el extremo 3' del dominio α -globina de pollo depende del estado de diferenciación eritroide.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcionalmente al silenciador del dominio α -globina de pollo en dos estadios de diferenciación eritroide: eritroblastos (HD3) y eritrocitos de 10 días de gestación (RBC de 10 días).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del silenciador sobre elementos positivos (promotor α^D y potenciador) del dominio α -globina de pollo en dos estadios de diferenciación eritroide.
2. Observar si la posición y orientación del silenciador respecto al promotor α^D y al potenciador del dominio α -globina de pollo afecta su actividad represora.
3. Identificar las secuencias dentro del silenciador que presenten relevancia funcional mediante deleciones secuenciales.
4. Conocer si la actividad del silenciador depende de su interacción con factores nucleares proteicos de los siguientes estadios específicos de diferenciación eritroide: pre-eritroblastos (6C2), eritroblastos (HD3) y eritrocitos de 10 días de gestación (RBC de 10 días).

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del silenciador del dominio α -globina de pollo y sus deleciones secuenciales por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron sintetizados por la compañía SIGMA. Todos los oligonucleótidos incluyen el sitio *BamHI* en la región 5' (Tabla 1).

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
ASIL1	CGCGGATCCCATGCACTCCTTACCCCATG
ASIL2	CGCGGATCCCAGCACAGCTTCACCCTGCG
D5'Sil	GCG GGATCC CAGC GTCTGTCATC GTCTGTGTG
DSil1	GCG GGATCC ACAGCGA GGACATGGTG AGGACC
DSil1-2	GCG GGATCC CAACAGG AACCATCAGC ACTTGGG
DSil2	GCG GGATCC CTGC TCTTTGGGCT ATGACCCTC
A120P4	CGC GGATCCGACGTGGGCAGCAGATAGCCTCG

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el silenciador del dominio α -globina de pollo y sus deleciones secuenciales por la técnica de PCR. En la primera columna se indica el nombre de los oligonucleótidos. En la segunda se muestra la secuencia en dirección 5' \rightarrow 3'. En el costado 5' se agregó el sitio de restricción para *BamHI* a fin de facilitar la clonación.

Las regiones denominadas Sil, D5'SE, DS1E, DS1-2E y DS2E fueron amplificadas utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos: ASIL1-ASIL2; D5'Sil-A120P4; DSil1-A120P4; DSil1-2-A120P4, y DSil2-A120P4 respectivamente (Fig. 12). Una vez purificados con el *Kit* de QIAEX Gel Extraction kit (150) catálogo 20021 (Qiagen), los fragmentos fueron digeridos con la enzima de restricción *BamHI* y ligados río abajo del promotor α^D en el plásmido pL α^D .

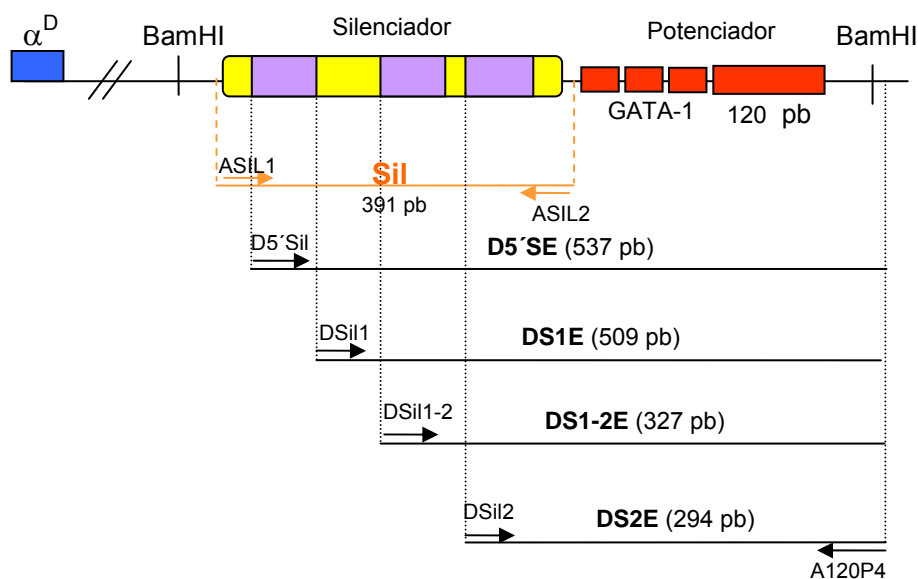


Figura 12. Diseño experimental de las deleciones secuenciales del silenciador. En la primera línea se esquematiza el costado 3' del dominio α -globina de pollo. En azul el promotor α^D , en amarillo el silenciador, en morado zonas de protección a la DNasa I del silenciador y en rojo el potenciador. Los oligonucleótidos usados están sobre flechas que indican desde donde se amplificaron los fragmentos. Sobre las líneas se encuentra el nombre de la región y su tamaño en pares de bases (pb) (Fig 12; adaptado de Recillas-Targa et al., 1993).

REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se llevaron a cabo reacciones de PCR con los pares de oligonucleótidos anteriormente mostrados (Tabla 1). El fragmento de 391 pb, correspondiente al silenciador del dominio α -globina de pollo, fue amplificado a partir de ADN genómico con los oligonucleótidos ASIL1 y ASIL2. Sin embargo, las deleciones del elemento silenciador se amplificaron a partir del plásmido pG3SilE4, previamente obtenido en el laboratorio, con los pares de oligonucleótidos mostrados en la Tabla 1 (Rincón-Arango et al., 2005). Las concentraciones y cantidades utilizadas para la amplificación del silenciador, como para cada una de las deleciones fueron las mismas, variando únicamente el par de oligonucleótidos utilizados. Dichas relaciones se muestran a continuación.

REACTIVOS	[Concentración]	μL por reacción
DNA genómico (<i>Gallus gallus domesticus</i>) o plásmido pG3SilE4	0.1 μg/ μL	1
dNTP's (Roche)	2.5 μM	1
Oligonucleótidos	2.5 μM (5'→3')	2
	2.5 μM (3'→5')	2
Amortiguador Qiagen	10 μM	2.5
MgCl ₂ (Roche)	25 μM	0.5
Taq polimerasa (Qiagen)	5 U/μL	1
H ₂ O desionizada	-----	15
	TOTAL	25 μL

Tabla 2. Relación de reactivos utilizados en las reacciones de PCR para la amplificación del silenciador y sus delecciones secuenciales. La primera columna muestra los reactivos utilizados, la segunda la concentración de los mismos y, la tercera, la cantidad en μL en cada reacción.

Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador GenAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo
95°C	5.0 min
95°C	1.5 min
60°C (T _M)	1.0 min
72°C	1.5 min
72°C	10 min
25°C	∞

} 30 Ciclos

Tabla 3. Programa de PCR utilizado en la amplificación del silenciador y sus delecciones secuenciales. T_M: temperatura de alineamiento de los nucleótidos.

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

pGSil

El vector pGSil fue diseñado para facilitar la subclonación del silenciador en otros plásmidos de interés. Para su diseño el fragmento de 391 pb, previamente amplificado por PCR, se purificó mediante el *kit* de QIAEX Gel Extraction kit (150) catálogo 20021(Qiagen) y se digirió, al igual que el vector de clonación pGEM11-Z(+) (Promega), con la enzima de restricción *Bam*HI. El vector linearizado se defosforiló con la enzima fosfatasa alcalina. Posteriormente, el inserto y el plásmido se purificaron por el *kit* de QIAEX. La reacción de ligación se llevó a cabo en una relación 3:1 (inserto-vector) en un Vol. final de 20 μ L a 4°C durante toda la noche. A continuación se transformaron por choque térmico bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α preparadas mediante la técnica de cloruro de calcio (ClCa₂) (Sambrook y Russell, 2001). Las bacterias se cultivaron con medio semisólido LB con ampicilina como marcador de selección.

Las bacterias que crezcan en dicho medio habrán adquirido el vector, pues éste contiene el gen de resistencia al antibiótico. De las colonias obtenidas se escogieron 10 al azar y se hicieron Minipreparaciones por la técnica de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Una vez purificado el DNA de cada colonia, se digirió con la enzima *Bam*HI a fin de escoger aquellas cepas en las que el silenciador se logró clonar con éxito. Para comprobar la orientación de la inserción del silenciador, se realizaron reacciones de PCR, escogiéndose dos colonias independientes en donde la orientación del silenciador fuera distinta. De cada una de las cepas se hicieron Maxipreparaciones, según el protocolo del *kit* Plasmid Maxi kit (100) catálogo 12103 (Qiagen), cuyo propósito fue obtener el vector de interés en gran escala. Ambos vectores denominados pG5'Sil y pG3'Sil, según la orientación del inserto, fueron secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del IFC de la UNAM y las secuencias se compararon con la reportada por Recillas-Targa y colaboradores (1993).

En todas las construcciones descritas a continuación, después de haber ligado los fragmentos a los diferentes plásmidos, se siguió el mismo procedimiento que para la construcción de pGSil.

pL α^D Sil

Con objeto de tener al silenciador río abajo del promotor α^D se diseñó el vector pL α^D Sil. Para ello se digirieron con la enzima *BamHI* tanto el plásmido pGSil como el plásmido pL α^D . Del primer plásmido se purificó y defosforiló el fragmento de 391 pb del silenciador y se ligó a pL α^D obteniendo dos vectores con diferente orientación del silenciador denominados pL α^D 5'Sil y pL α^D 3'Sil.

pLSil α^D E

La construcción pLSil α^D E se diseñó con el fin de separar al silenciador del potenciador. El vector pL α^D E4 fue digerido con las enzimas *SacI* y *NheI* y el plásmido pGSil con las enzimas *SacI* y *XbaI*. Como *XbaI* y *NheI* son enzimas compatibles, el fragmento silenciador se pudo ligar fácilmente al plásmido pL α^D E4, resultando las construcciones con diferente orientación pL5'Sil α^D E y pL3'Sil α^D E.

pL α^D (SE)

El fragmento de 1060 pb que contiene al silenciador y al potenciador en la misma posición que en el contexto endógeno, se obtuvo del plásmido pG3SilE4 (previamente diseñado y construido en el laboratorio) por digestión enzimática con *BamHI*. El fragmento se introdujo en el vector pL α^D . A partir de la ligación se obtuvieron dos plásmidos con distinta orientación: pL α^D 5'(ES) y pL α^D 3'(ES).

pL α^D y pL α^D E4

Estos plásmidos, cuya actividad resultante sirve de comparación de la actividad de aquellos plásmidos que contienen al silenciador, se obtuvieron previamente en el laboratorio (Rincón-Arano et al., 2005).

Deleciones Secuenciales

Para localizar secuencias relevantes en la función del silenciador, se construyeron plásmidos con deleciones secuenciales en el mismo. Una vez obtenidos y purificados los fragmentos mostrados en la figura 12, éstos se insertaron en el sitio *BamHI* del vector pL α^D . Los vectores obtenidos se denominaron pL α^D D5' SE, pL α^D DS1E, pL α^D DS1-2E y pL α^D DS2E. Para indicar la orientación del inserto, el segmento se pone entre paréntesis y al costado izquierdo se indica la orientación, por ejemplo: pL α^D 5'(D5' SE) y pL α^D 3'(D5' SE) para la primera deleción.

Todas las enzimas utilizadas para la construcción de plásmidos fueron de la compañía New England Biolabs y las escaleras de peso molecular de la compañía Fermentas.

CULTIVO CELULAR

La línea celular 6C2 corresponde a células de médula ósea transformadas por el virus de eritroblastosis aviar. Estas células están arrestadas en el estadio eritroide CFU-E, por lo que son consideradas pre-eritroblastos (Rincón-Arano et al., 2005). La línea celular 6C2 fue cultivada en medio mínimo esencial (α -MEM; GIBCO) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino, 2% (v/v) de suero de pollo, 1 mM Hepes (pH 7.2) y 50 μ M de 2-mercaptoetanol.

La línea celular HD3, correspondiente a eritroblastos de pollo, son células primarias de pollo transformadas por el virus de la eritroblastosis aviar que contiene el oncogen *v-erbA* y al mutante sensible a la temperatura ts34 del

oncogen *v-erbB* (Grdisa y White, 2003). La línea celular HD3 fue cultivada en medio DMEM (GIBCO) suplementado con 8% (v/v) de suero fetal bovino, 2% (v/v) de suero de pollo y 1% de penicilina-estreptomicina.

Las condiciones ambientales para la incubación de las líneas celulares fueron 37 °C a una concentración de CO₂ de 5%.

Las células eritroides de pollo (RBC), obtenidas de las venas superficiales de embriones 10 días, se mantuvieron en medio L-15 (GIBCO) suplementado con 5% (v/v) de suero fetal bovino, 2% (v/v) de suero de pollo y 1% de penicillina-estreptomicina después de la transfección.

Tanto los medios de cultivo como los sueros fueron adquiridos a la compañía Invitrogen.

TRANSFECCIONES TRANSITORIAS

Transfecciones transitorias en células HD3

Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min en la centrífuga Labofuge 400R Sorvall Heraeus, la pastilla celular se resuspendió en 20 mL de D-MEM complementado (Apéndice) y se calculó el número de células en ese volumen haciendo uso de la cámara de Neubauer. 2 µg de cada plásmido fueron transfectados por lipofección (1 µg de lipofectamina) a 2X10⁶ células resuspendidas en 2 mL de D-MEM sin complementar. Después de incubar por 4 h se adicionaron otros 2.5 mL de D-MEM complementado y se dejó incubando las células por 24 h más. Transcurrido el tiempo, las células se centrifugaron 2 min a 13000 rpm y se obtuvieron extractos nucleares totales con 100 µL de amortiguador de lisis (Passive lysis amortiguador, Promega).

Posteriormente se leyó la actividad del gen reportero (Luciferasa) en el luminómetro TD-20/20 de Turner Designs. Cabe señalar que las variaciones experimentales entre las muestras fueron normalizadas mediante la co-transfección del plásmido pRL-CMV (Citomegalovirus) que expresa constitutivamente a la luciferasa de la Renilla.

En cada uno de los ensayos los plásmidos fueron transfectados, al menos, por triplicado.

Transfecciones transitorias en eritroblastos de embriones de pollo (RBC de 10 días)

Se recolectó la sangre de las venas superficiales de embriones de pollo en 25 mL de PBS 1X (Apéndice) con 10% de EDTA. La sangre se centrifugó 10 min a 1000 rpm en la centrífuga Labofuge 400R Sorvall Heraeus, se lavó la pastilla celular y se resuspendió en 10 mL de la misma solución. En este paso se tomaron 3 alícuotas de 10 μ L y se diluyeron con 1490 μ L del amortiguador de lisis (Apéndice). Se cuantificaron las células por espectrofotometría considerando que 1 OD leída a 412 nm corresponde a 8.56×10^6 células (Hesse et al., 1986; Mason et al., 1996). Una vez hecho el cálculo se volvieron a centrifugar las células por 5 min a 1200 rpm y la pastilla celular se resuspendió en un volumen tal que hubiera 1×10^8 células en 500 μ L por cada transfección.

Por cada una se adicionaron 2 μ L del plásmido de interés y como control interno se co-transfectaron 2 μ L del vector pRL-CMV que contiene la región promotora del CMV y expresa constitutivamente a la Luciferasa de Renilla. 500 μ L de células se mezclan con los plásmidos en celdas para electroporación. Se electropora a 500 V y se adiciona 1 mL de medio L-15 complementado (Apéndice). Las células se incuban de 24 a 36 h a 37°C. Después de este tiempo la actividad de la Luciferasa se determina como en la línea celular HD3.

ENSAYOS DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA RETARDADA

Preparación de las sondas

Los pares de oligonucleótidos para los sitios SF1, SF2 y SF3, que fueron definidos por su capacidad para ser reconocidas por factores nucleares (Recillas-Targa et al, 1993), se prepararon a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla 4). 2.5 μL de cada par fueron incubados con 1 μl de γ -ATP 250 μCi y con la enzima T4 Polynucleotide Kinase, cinasa que incorpora un grupo fosfato marcado radioactivamente. La reacción se dejó 30 min a 37°C y después se agregó 1 μL de EDTA para detener la reacción. Los oligonucleótidos fueron mezclados en un volumen de 20 μL en presencia del amortiguador de alineamiento (Apéndice) para aparear las cadenas nucleotídicas complementarias. Las sondas se mantuvieron 1 h a 60°C y, posteriormente, 30 min a temperatura ambiente. Para purificar las sondas y eliminar la radioactividad no incorporada, se preparó un gel de acrilamida-urea al 10%-8%, respectivamente y se recorrió por 1 h 30 min a 150 V. El gel se cargó con las sondas y se corrió en las mismas condiciones.

Una vez pasado este tiempo, se colocó una placa fotográfica sobre el gel y se expuso durante 5 min. Posteriormente se cortó la placa en los lugares donde se marcaron las sondas y se obtuvieron los pedazos de gel donde se encontraban presentes. Para separar las sondas del gel, se les adicionó el amortiguador de elución (Apéndice) y se dejaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente, las sondas se precipitaron con una décima parte de acetato de sodio 3M pH 5.2, 3 volúmenes de etanol absoluto y 1 μL de glicógeno como acarreador. Las pastillas de DNA se resuspendieron en 40 μL de agua estéril y se cuantificaron las CPM en un contador de centelleo. Las concentraciones obtenidas se ajustaron con agua a una concentración final de 10000 CPM/ μL .

Sonda	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
SF1	A1	AACATTTCCAGCGTCTGTCATCGTCTGTGTGGTGACACAG
	A2	CTGTGTCACCACACAGACGATGACAGACGCTGGAAATGTT
SF2	A7	CTTGTGAACCATCAGCACTTGGGGCTCAGT
	A8	ACTGAGCCCCAAGTGCTGATGGTTCACAAG
SF3	A9	TCCTGCTCTTTGGGCTATGACCCTCAGCA
	A10	TGCTGAGGGTCATAGCCCCAAGAGCAGGA

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la preparación de sondas. Para el ensayo de movilidad electroforética retardada se utilizaron las sondas cuyo nombre aparece en la primera columna; en la segunda el nombre de los oligonucleótidos y, finalmente, las secuencias en orientación 5' → 3'.

Preparación y cuantificación de extractos celulares

9x10⁶ células de pollo (HD3, 6C2 y RBC de 10 días) se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Las pastillas celulares se resuspendieron en 1 mL de PBS (Apéndice) volviéndose a centrifugar por 15 seg a máxima velocidad. Se desechó el sobrenadante y las pastillas celulares se resuspendieron en 400 µL de amortiguador A frío (Apéndice) y por 15 min se mantuvieron en hielo. Se adicionaron 25 µL del detergente IGEPAL CA-630 (SIGMA) agitando vigorosamente el tubo por 10 seg. El homogenado se centrifugó 30 seg a 13000 rpm y la pastillas nucleares se resuspendieron en 50 µL de amortiguador C frío. Las mezclas se agitaron a 4°C por 15 min. Se centrifugaron 5 min a 8000 rpm a 4°C y los sobrenadantes se congelaron a -70°C hasta el momento de usarse.

Para la cuantificación de extractos se preparó una curva de calibración utilizando BSA (Albúmina de Suero Bovino) desde una concentración de 9.75 hasta 5000 ng/ µL. Se tomaron 4 µL de extractos y se llevaron con agua a 80 µL con lo cual quedó una dilución de 1:20. De esta solución se tomaron 10 µL adicionándole 90 µL de agua. Los extractos, en este caso, quedan diluidos 200 veces. Tanto a la curva como a los extractos se les adicionaron 200 µL de azul de Coomassie (GIBCO) diluido 1:5, dicho reactivo reacciona con proteínas produciendo un cambio de color en las muestras fácilmente detectado por el equipo de ELISA (Microplate reader, Modelo 550, BIO-RAD).

Interacción Sonda-Extractos Nucleares

Para cada punto experimental se adicionaron 10 μL del amortiguador GSB 2X (Apéndice), 1 μL DTT 1M, 1 μL de poli-dIdC a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Amersham), los μL equivalentes a 10 μg de extractos y el agua bidestilada necesaria para tener, junto con la sondas, un volumen final de 20 μL . Cada muestra se mantuvo 15 min en hielo seguidos de 15 min a temperatura ambiente, antes de agregar 2 μL de sonda fría (50 y 100 ng/ μL) a las muestras a ser competidas. Nuevamente los tubos permanecieron 15 min en hielo y 15 min a temperatura ambiente para posteriormente adicionar a todas las muestras experimentales 2 μL de sonda radioactiva, mezclar y mantener otra media hora en hielo y a temperatura ambiente.

Simultáneamente con la preparación de las muestras se prepara un gel de acrilamida al 5% y se deja precorrer por 1 h. Las muestras se cargan en el gel y se corren por 2 h a 150 V. Después el gel se seca, se le coloca encima una pantalla fotosensible que detecta la radiación y se deja exponer en el cassette del storm por, al menos, 6 h. Finalmente la pantalla es escaneada por el equipo Typhoon 8600 en la Unidad de Biología Molecular del IFC y leída con el programa ImageQuant.

GEL DE PROTEÍNAS

Se prepara un gel a 7.5% que contiene amortiguador resolovedor y espaciador (Apéndice), acrilamida (40%), SDS (10%), APS (10%), 10 μL de TEMED y agua. Por otra parte, las muestras de los extractos proteicos de cada tipo celular (6C2, HD3 y RBC) se calentaron por 5 min a 95°C junto con el amortiguador muestra (Laemmli Amortiguador) (Apéndice) en igual relación de volumen. Este amortiguador contiene β -mercaptoetanol, agente reductor que rompe los puentes disulfuro de las proteínas. Una vez cumplido el tiempo, el gel se cargó con las muestras y se corrió a 25 mA por 1 h. posteriormente, se desmontó y tiñó con azul de Coomasie (GIBCO).

RESULTADOS

Con el fin de caracterizar al elemento silenciador del dominio α -globina de pollo, se presenta en esta sección, en primer lugar, la amplificación de la región del silenciador y la obtención de los diferentes plásmidos descritos en materiales y métodos. En segundo lugar, se muestran gráficamente los datos aportados por las transfecciones transitorias de los plásmidos anteriormente mencionados, tanto en eritrocitos como en eritroblastos de pollo. En tercer lugar se exponen los geles de los ensayos de retardo electroforético de las regiones del silenciador identificadas como SF1, SF2 y SF3 (Fig. 9) y, finalmente, se muestra el análisis bioinformático de la secuencia del silenciador por el programa TESS.

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN DEL SILENCIADOR POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se amplificó la región del silenciador por la técnica de PCR, utilizando los oligonucleótidos ASIL1 y ASIL2 así como las condiciones descritas en la sección de materiales y métodos (Fig. 12). El fragmento del silenciador de 391 pb, se amplificó a partir de DNA genómico de pollo extraído en el laboratorio.

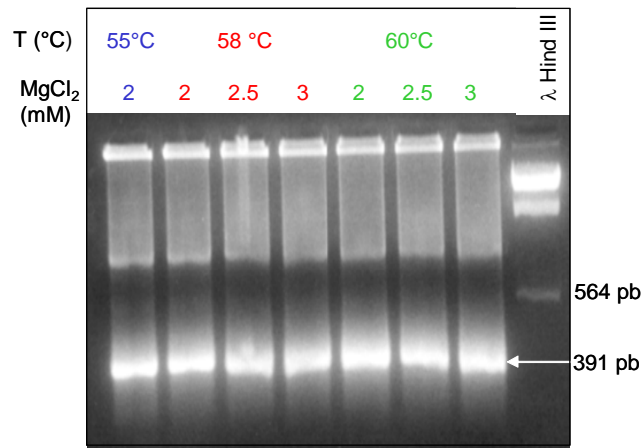


Figura 13. Calibración de la reacción de PCR del silenciador. En distintos colores se muestran reacciones de PCR realizadas bajo diferentes condiciones de temperatura y concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂). El último carril muestra el marcador de peso molecular λ -HindIII. La última banda corresponde a 564 pb. La flecha blanca indica la banda de 391 pb del silenciador.

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS

pGSil

Partiendo del procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos, se obtuvieron dos plásmidos: pG5'Sil y pG3'Sil cuya diferencia reside en la dirección de inserción del silenciador (Fig. 14 y 15). Los segmentos insertados se secuenciaron y compararon con la secuencia reportada previamente por Recillas-Targa y colaboradores (1993). Los segmentos clonados difirieron entre ellos en dos pares de bases mientras que, respecto a la secuencia reportada, se encontraron más diferencias (Fig. 16). Tomando en cuenta los siguientes factores: 1) que la obtención por PCR del silenciador fue a partir de DNA genómico, 2) que el método de secuenciación utilizado es más sensible que el utilizado por Recillas-Targa y colaboradores, 3) que las diferencias entre pares de bases no se encuentran en las regiones donde podrían interaccionar factores transcripcionales (Recillas-Targa et al., 1993) y, 4) que dichas diferencias se deban a polimorfismos, es por lo que se decidió continuar con la subclonación del silenciador.

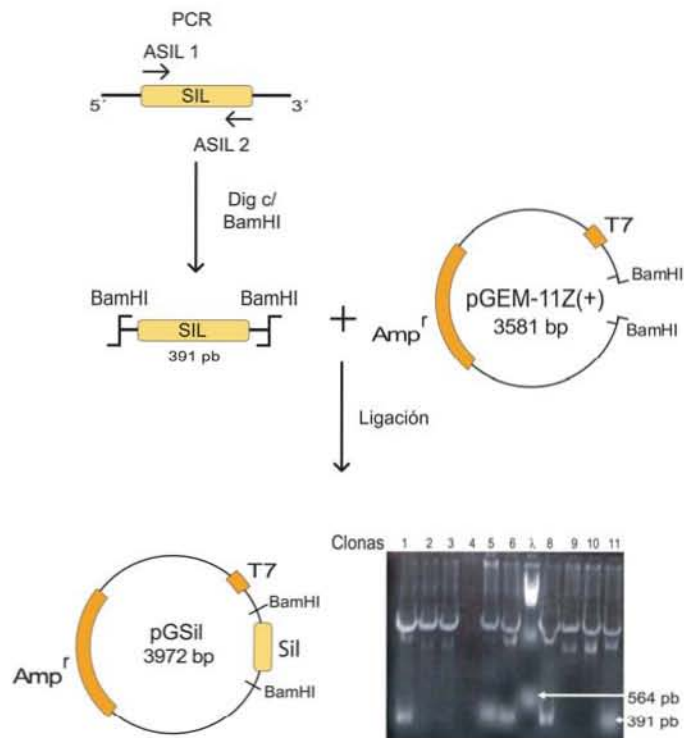


Figura 14. Clonación del silenciador en pGEM-11Z(+). El silenciador de 391 pb amplificado por PCR se digirió con *Bam*HI y se ligó al vector pGEM-11Z(+). El nuevo plásmido denominado pGSil se obtuvo en 5 colonias bacterianas: carriles 1, 5, 6, 8 y 11.

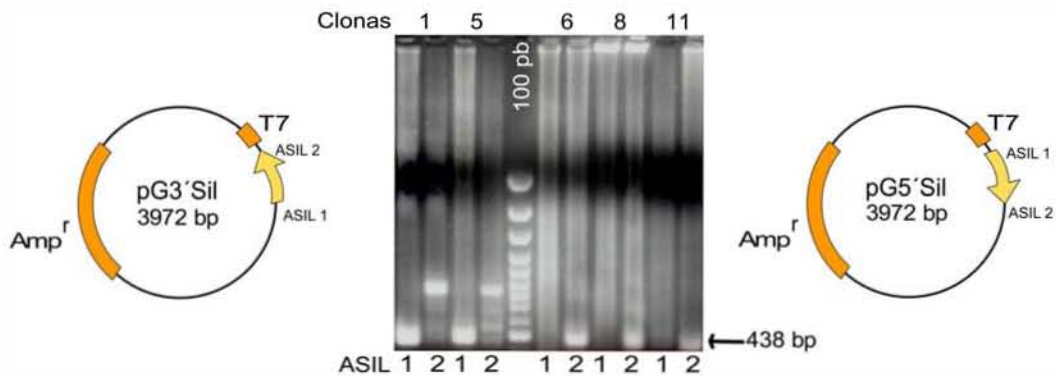


Figura 15. PCR para comprobar direccionalidad del silenciador. En todas las reacciones de PCR se utilizó al oligonucleótido T7, el cual reconoce al vector pGEM-11Z(+), junto con uno de los oligonucleótidos ASIL. Aquellos fragmentos del silenciador amplificados con ASIL1 están en dirección 3'→ 5', mientras que los amplificados con ASIL2 se encuentran en dirección 5'→ 3'. El fragmento esperado es de 438 pb, que corresponde al silenciador más el segmento aportado por T7 (47 pb). El marcador utilizado es la escalera de 100 pb. La última banda observada de la escalera es de 500 pb.

pL α^D Sil

El fragmento correspondiente a la región del silenciador se subclonó en el vector pL α^D para observar la posible influencia del silenciador sobre el promotor (Fig. 17).

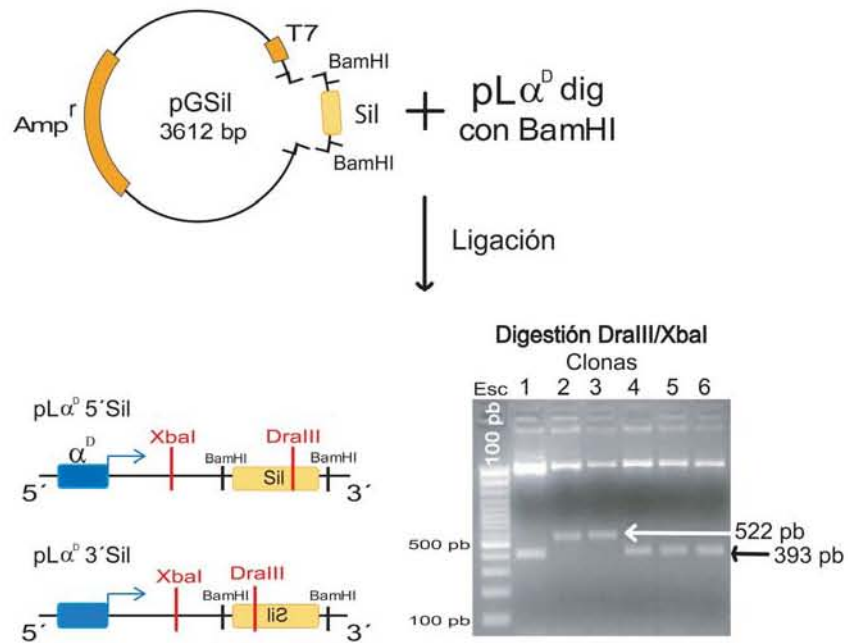


Figura 17. Subclonación del silenciador en el vector pL α^D . El silenciador (rectángulo amarillo) obtenido del vector pGSil se insertó en pL α^D . La direccionalidad del silenciador se determinó por medio de la digestión enzimática con *DraIII* y *XbaI*. Las bandas de 522 pb indican que el silenciador está insertado de 5' a 3', las bandas de 393 pb indican la orientación contraria. El promotor α^D se muestra en azul.

pLSil α^D E

La construcción pLSil α^D E se hizo con el objetivo de separar al silenciador del potenciador y, a partir de ello, saber si es condición necesaria tener a estos elementos adyacentes para que el silenciador reprima la actividad transcripcional. Para lograr la construcción, se aprovechó que las enzimas *NheI* y *XbaI* son compatibles (Fig. 18).

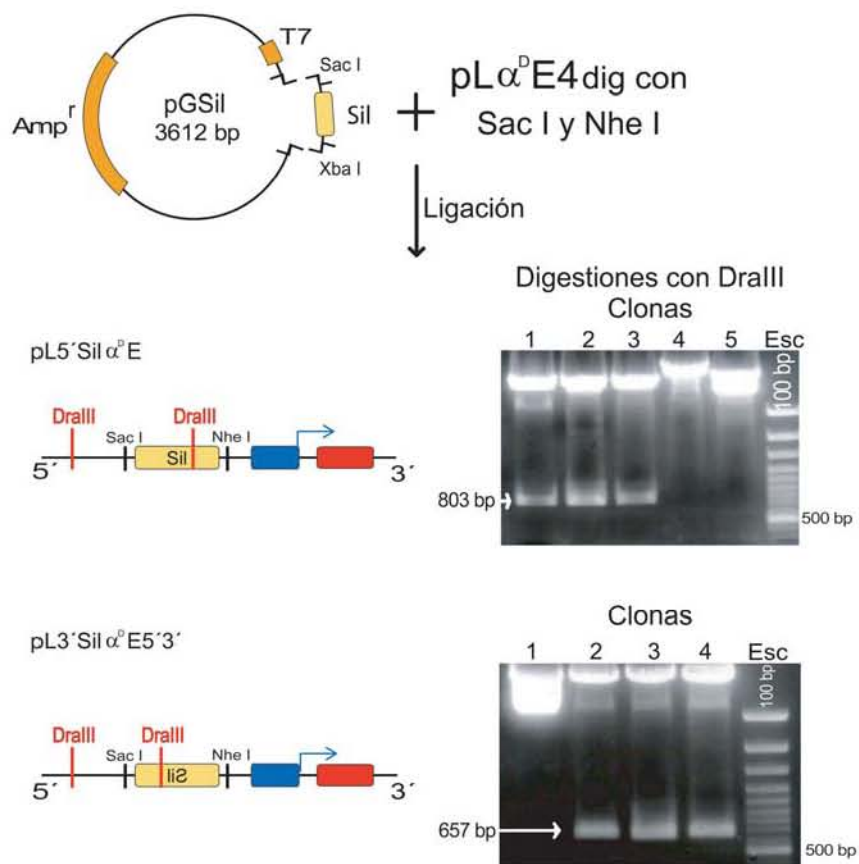


Figura 18. Subclonación del silenciador en el vector pL α^D E4. El silenciador obtenido del plásmido pGSil se insertó río arriba del promotor α^D en el plásmido pL α^D E4. Para comprobar la presencia del elemento negativo en el vector, se realizó una digestión enzimática con *DraIII*. La banda de 803 pb indica que el silenciador se insertó de 5' a 3'. La banda de 657 pb indica la inserción del elemento en orientación 3' a 5'.

pL α^D (SE)

El segmento Sil-Enh de 1060 pb se clonó en pL α^D . Uno de los vectores resultantes, pL α^D 5'(SE), tiene a los elementos de regulación en el mismo orden que en el contexto endógeno. En el vector pL α^D 3'(SE), en cambio, el potenciador se coloca entre el promotor y el silenciador (Fig. 19).

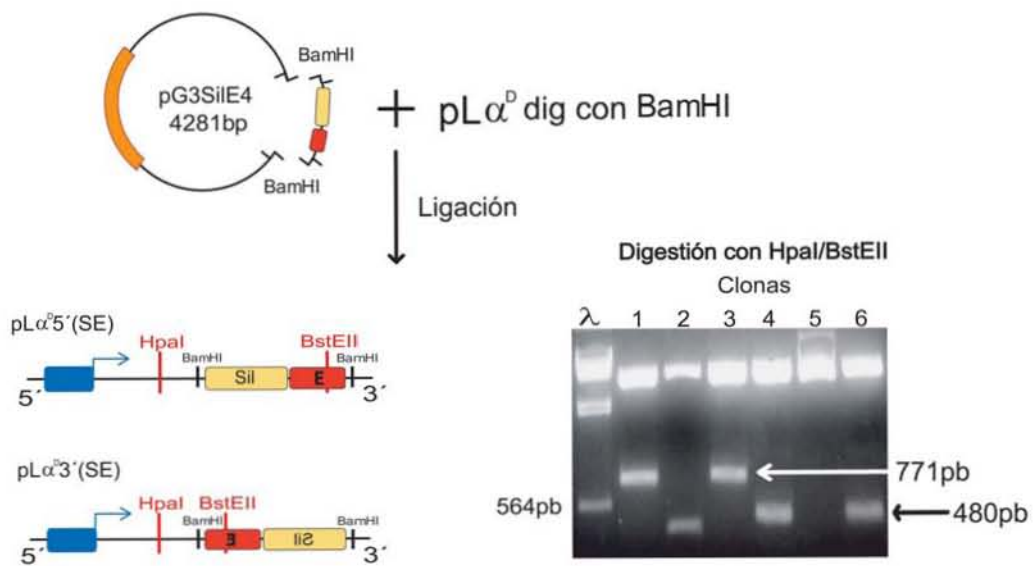


Figura 19. Clonación del fragmento silenciador-potenciador en pL α^D . Se comprobó la orientación del fragmento Sil-Enh por medio de la digestión enzimática con *HpaI* y *BstEII*. Las bandas de 771 pb indican que el inserto se introdujo en dirección 5'→3'. Las bandas de 480 pb indican la dirección contraria.

pL α^D y pL α^D E4

Para comprobar la presencia e integridad de los elementos de regulación del dominio α -globina de pollo, el promotor α^D y el potenciador, se realizaron digestiones enzimáticas en los plásmidos pL α^D y pL α^D E4 (Fig. 20).

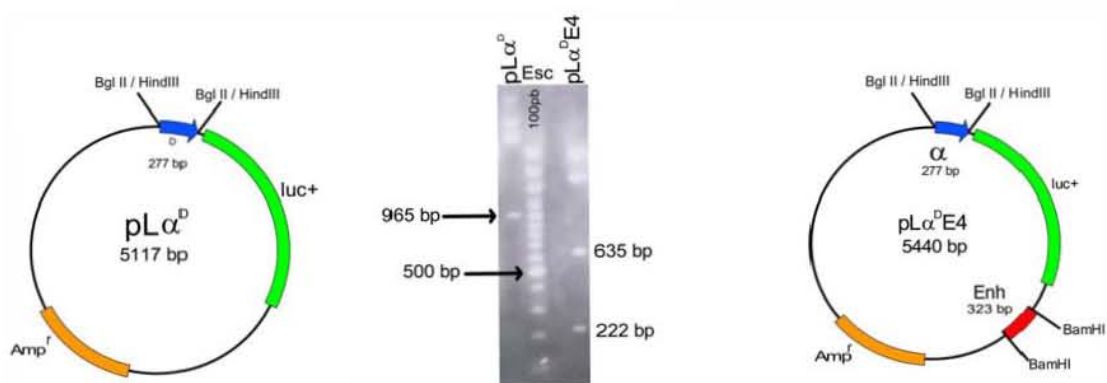


Figura 20. Digestiones enzimáticas de pL α^D y pL α^D E4. Del lado izquierdo se observa el esquema de pL α^D . Este vector fue digerido con *SphI*, obteniéndose una banda de 965 pb que señala que el promotor se encuentra en orientación 5' a 3'. Del lado derecho se muestra el vector pL α^D E4. Este vector se digirió con las enzimas *AvaI* y *HpaI*. Se obtuvo una banda de 222 pb que indica que la orientación del potenciador va de 3' a 5'. En medio del gel se muestran los fragmentos de DNA correspondientes y el marcador de 100 pb.

Deleciones Secuenciales

Para localizar secuencias dentro del silenciador relevantes para su función, se diseñaron una serie de plásmidos con deleciones del elemento negativo (Fig. 21), y cuya obtención se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

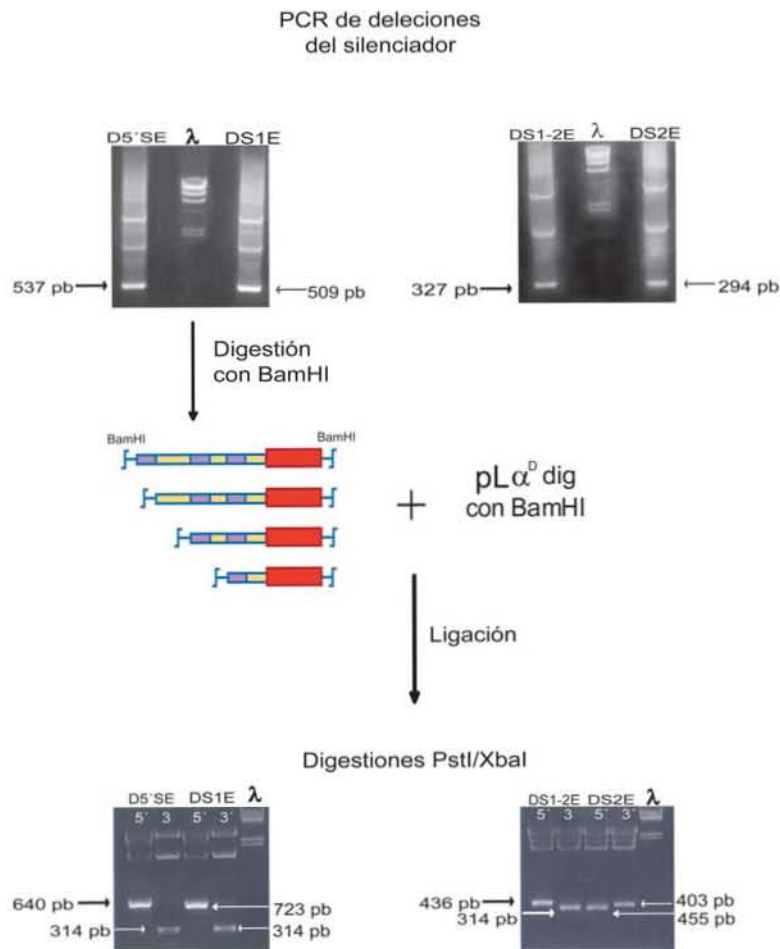


Figura 21. Deleciones secuenciales del silenciador. Los gels que aparecen en la parte superior de la figura muestran los fragmentos de amplificación obtenidos por PCRs, cuyos pesos moleculares coinciden con lo esperado. Después de las ligaciones entre las deleciones y el vector $pL\alpha^D$, se comprobó la orientación de las clonas por medio de la digestiones enzimáticas con *PstI* y *XbaI*, tal como aparece en los gels que muestran en la parte inferior de la figura.

TRANSFECCIONES TRANSITORIAS EN ERITROBLASTOS (HD3) Y ERITROCITOS DE POLLO (RBC de 10 días)

Con el propósito de determinar la relación funcional del silenciador en el contexto del promotor α^D y potenciador, se decidió transfectar transitoriamente a los plásmidos pL α^D , pL α^D E4, pL α^D Sil, pLSil α^D E y pL α^D (SE) en la línea celular HD3 y en cultivos primarios de eritrocitos de pollo, RBC de 10 días de gestación.

La función del silenciador se evaluará con respecto a las transfecciones de dos tipos de construcciones, las que sólo contienen al promotor α^D y las que contienen a este elemento junto al potenciador.

Los resultados obtenidos al transfectar transitoriamente a las células HD3, muestran que en la construcción donde se encuentra el potenciador río abajo del promotor, la actividad aumenta alrededor de dos veces con respecto a la construcción que sólo contiene al promotor α^D (Fig. 22; construcciones 1 y 2). Esta variación, confirmada numerosas veces en nuestro laboratorio (Rincón-Arano et al., 2005), sugiere que en este estadio de diferenciación temprano el gen adulto α^D está silenciado.

En el mismo grupo de ensayos, se observa que la actividad transcripcional que presentan aquellas construcciones donde se encuentran únicamente el silenciador y el promotor α^D , es ligeramente menor a la actividad generada por el promotor solo. Este fenómeno es observado sin importar la orientación del silenciador y sugiere la posibilidad de que el elemento negativo tenga un efecto débil sobre el promotor α^D (Fig. 22; construcciones 1, 3 y 4).

Las construcciones 5 y 6 resultan interesantes, pues este es el primer ensayo donde se observa el efecto al separar al silenciador del potenciador, elementos de regulación que en su contexto natural están lado a lado. Los resultados muestran que el efecto del silenciador, en presencia del potenciador, es más pronunciado que en aquellas construcciones donde sólo se encuentra con el promotor α^D . Tal

parece que el silenciador actúa sobre los dos elementos positivos, pero preferencialmente sobre el potenciador. Cabe señalar que el silenciador suprime la actividad transcripcional no importando la orientación ni la posición en la que se encuentre por lo que, el hecho de que el silenciador y el potenciador estén adyacentes, parece, en este contexto, no ser relevante para su función (Fig. 22; construcciones 5 y 6).

En la penúltima construcción, en la que los tres elementos de regulación se encuentran distribuidos en el mismo orden que en el contexto endógeno (Fig. 22; construcción 7), se observa que la represión transcripcional es similar a todas aquellas construcciones que contienen al potenciador (Fig. 22; construcciones 5, 6, 7 y 8). Hay que hacer notar que estos datos no implican que el efecto represor suceda *in vivo*, sino que las proteínas que activan al silenciador están presentes en la línea celular HD3.

En la última construcción, donde se ha invertido la orientación y la posición tanto del potenciador como del silenciador se observa un decremento de la actividad transcripcional (Fig. 22; construcción 8), es decir, la situación del potenciador respecto a los otros elementos de regulación tampoco bloquea el efecto represor del silenciador.

TRANSFECCIONES EN HD3

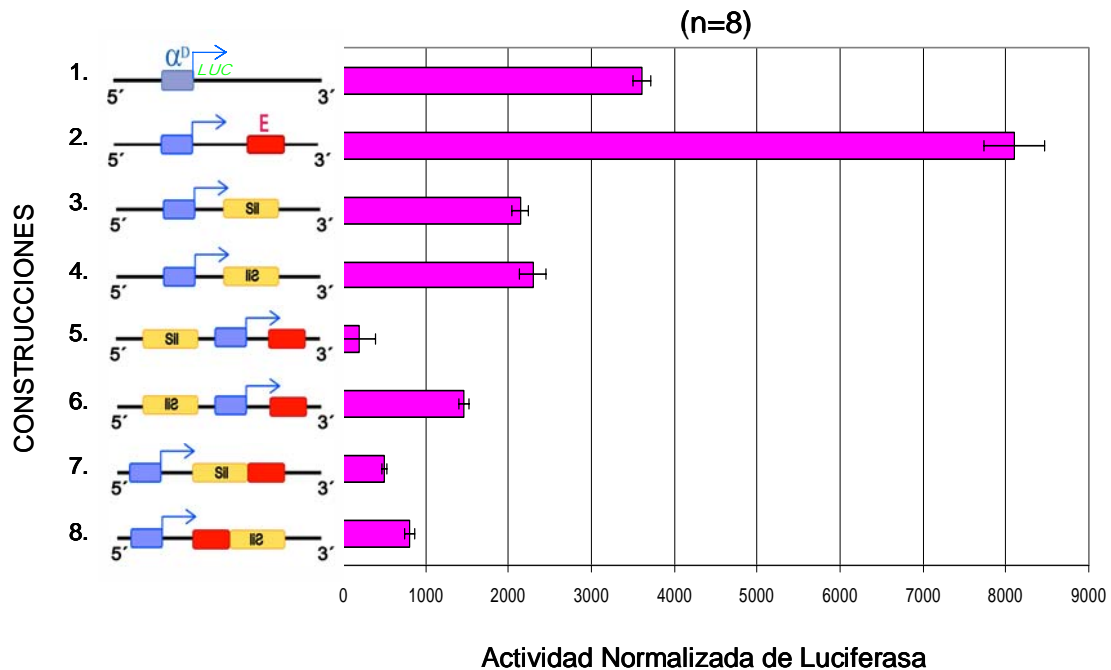


Figura 22. Transfecciones transitorias en eritroblastos de pollo (HD3). Cada plásmido fue transfectado al menos 8 veces. El silenciador se representa en amarillo, el promotor α^D en azul y el potenciador (E) en rojo.

Las transfecciones anteriores realizadas demuestran que este silenciador en HD3 se comporta como un elemento autónomo que abate la actividad tanto del promotor como del potenciador, y que ejerce su efecto independientemente de la orientación y la posición con respecto a ambos elementos de regulación positiva.

En RBC de 10 días, a diferencia de las transfecciones en HD3, se observa un incremento significativo de alrededor de 90 veces entre la señal generada por la construcción que contiene únicamente al promotor α^D y aquella en la que el promotor se encuentra junto al potenciador (Fig. 23; construcciones 1 y 2). La actividad del potenciador en este cultivo primario es consistente con los datos publicados en el laboratorio (Rincón-Arango et al., 2005) y sugiere que en este estadio tardío del desarrollo el gen adulto α^D está siendo transcrito.

Vale la pena subrayar que en las construcciones donde se encuentran el silenciador y el promotor α^D hay un aumento de la actividad transcripcional con respecto de la construcción donde se encuentra solamente el promotor α^D (Fig. 23; construcciones 3 y 4). Es difícil la interpretación de este dato, pero parece indicar que el silenciador no ejerce un efecto represor sobre el promotor.

Al probar las construcciones donde se encuentran el promotor α^D , el potenciador y el silenciador, se observa una disminución de la actividad generada por el potenciador (Fig. 24; construcciones 5-8). De esto se infiere que, en eritrocitos de 10 días de gestación a diferencia de células HD3, el silenciador está actuando únicamente sobre el potenciador y no sobre este elemento y el promotor α^D . Esta capacidad de represión por parte del silenciador es independiente de la posición y la orientación que guarda en el contexto endógeno.

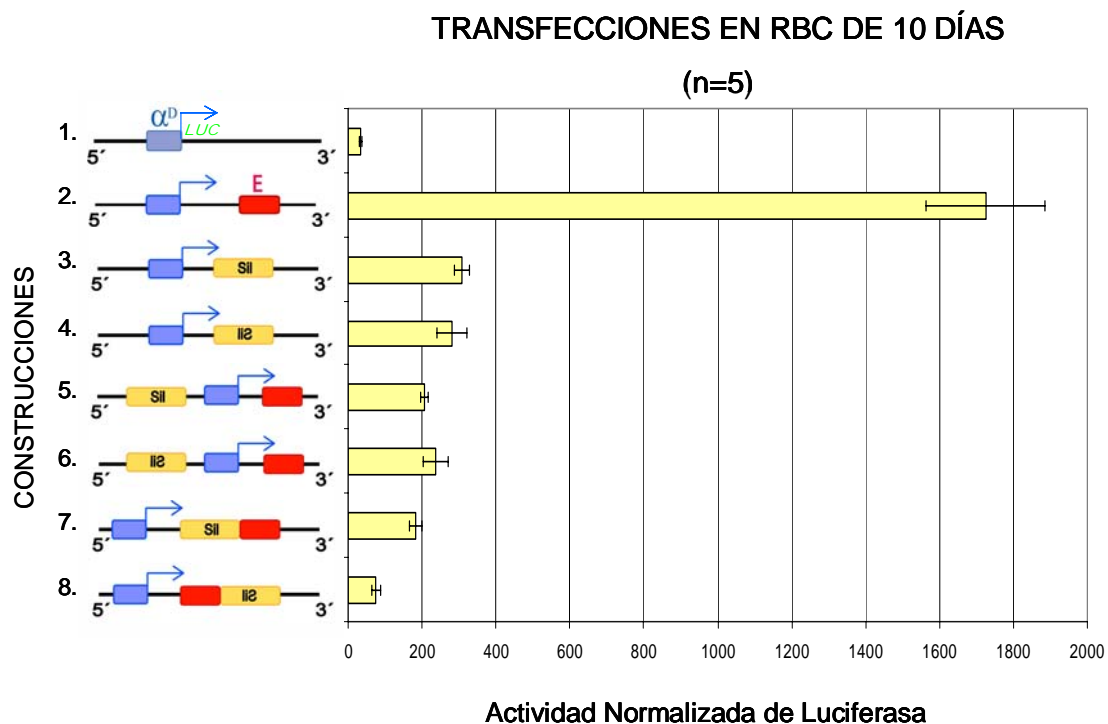


Figura 23. Transfecciones transitorias en eritrocitos de 10 días de gestación (RBC). Cada plásmido fue transfectado al menos 5 veces. El silenciador se representa en amarillo, el promotor α^D en azul y el potenciador (E) en rojo.

Deleciones secuenciales

Las transfecciones en HD3 muestran que las actividades del promotor α^D , el potenciador y el silenciador son totalmente reproducibles en comparación a los datos obtenidos en las transfecciones anteriores (Fig. 22; construcciones 1, 2 y 7 y Fig. 24; construcciones 1-3).

Con objeto de localizar secuencias funcionalmente relevantes dentro del silenciador, se diseñaron plásmidos que contuvieran deleciones secuenciales del elemento negativo. Dichos plásmidos fueron transfectados en células HD3 y RBC de 10 días.

En términos generales, las deleciones no muestran un patrón claro, reflejo de la complejidad del elemento regulador en estudio. No obstante, al comparar los datos de las transfecciones de las deleciones (Fig. 24; construcciones 4-11) con los datos obtenidos con la construcción de referencia (Fig. 24; construcción 3), en todos los casos, en mayor o menor grado, se observa una pérdida de la actividad silenciadora.

En particular, la descripción e interpretación de las deleciones pueden plantearse en tres puntos:

1. La remoción de la región 5' al sitio de unión SF1 causa una pérdida notoria en la actividad del silenciador (Fig. 24; construcción 5).
2. Las deleciones de la región del sitio de unión SF1 con la región 5' próxima a él, provocan la pérdida mayoritaria de la actividad silenciadora (Fig. 24; construcciones 6 y 7).
3. El sitio SF3 junto con la secuencia 3' es capaz de mantener una actividad silenciadora parcial, tal como puede observarse en las construcciones 4, 8 y 11, si bien mayor a la construcción de referencia (Fig. 24; construcción 3).

En resumen, los datos arrojados por las transfecciones transitorias de las deleciones secuenciales del silenciador, muestran un patrón muy complicado para su interpretación. Sin embargo, la observación más clara y contundente es que la integridad del silenciador es imprescindible para su actividad represora (Fig. 24; construcción 3).

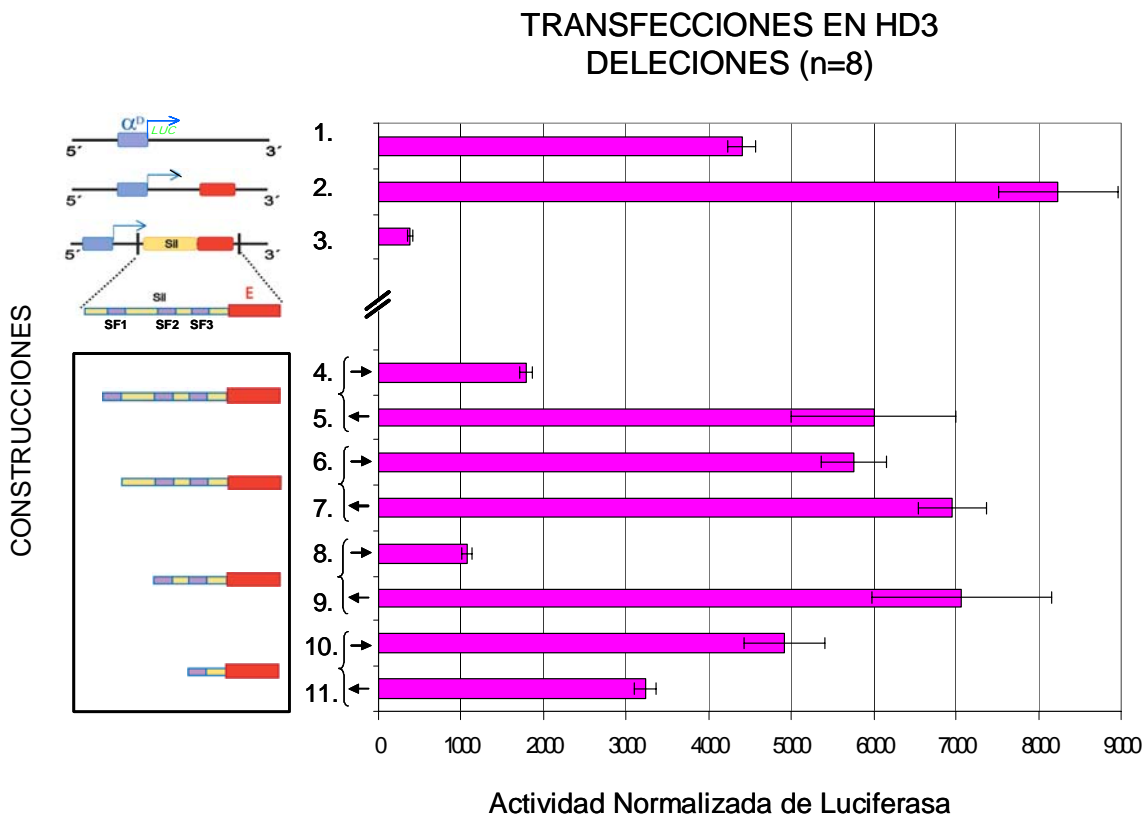


Figura 24. Transfecciones transitorias de deleciones secuenciales del silenciador en eritroblastos de pollo (HD3). El diseño de las deleciones del silenciador, parte del ensayo de protección a la DNasa I realizado por Recillas-Targa et al. (1993). Cada plásmido fue transfectado al menos 8 veces. El silenciador se representa en amarillo, el promotor α^D en azul y el potenciador (E) en rojo. En morado se muestran las secuencias del silenciador correspondientes a SF1, SF2 y SF3.

Las transfecciones de las construcciones de referencia en RBC de 10 días muestran, una vez más, datos consistentes con los observados anteriormente (Fig. 23; construcciones 1, 2 y 7 y Fig. 25; construcciones 1-3).

Los resultados obtenidos en las transfecciones transitorias de las delecciones secuenciales en el cultivo primario de RBC de 10 días parecen ser menos claras que los datos obtenidos transfectando los mismos plásmidos en la línea celular HD3. A pesar de ello, las conclusiones parecen ser similares en ambos tipos celulares. Es decir, podría afirmarse que la correcta función del silenciador depende de su integridad.

Llama la atención observar datos donde el efecto silenciador se encuentra potenciado (Fig. 25; construcciones 7 y 10), o bien, es igual que en la construcción de referencia (Fig. 25; construcciones 3, 5 y 11). Recordando que la actividad del potenciador es significativamente más fuerte en RBC que en HD3 tal como se afirmó anteriormente, los efectos resultantes de las construcciones con las delecciones del silenciador, podrían no observarse tan evidentes, sin embargo, se tienen efectos como los obtenidos para la delección de la región 5' al sitio SF1 (Fig. 25; construcción 4) y para la pérdida del sitio SF1 (Fig. 25; construcción 6).

En síntesis, los datos en células de eritrocitos de 10 días (RBC) no son concluyentes, a pesar de mostrar cierta consistencia en la tendencia con los datos obtenidos con la línea celular HD3. En ambas situaciones, la integridad del silenciador para ejercer su función represiva es necesaria.

TRANSFECCIONES EN RBC DE 10 DÍAS DELECCIONES (n=5)

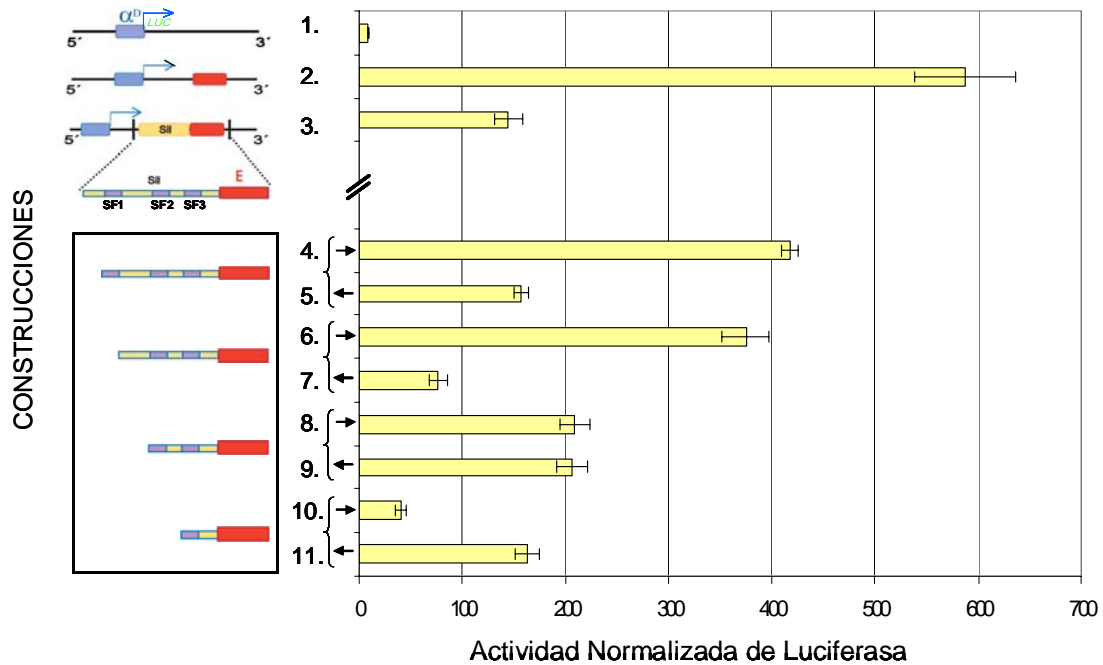


Figura 25. Transfecciones transitorias de delecciones secuenciales del silenciador en eritrocitos de 10 días (RBC). El diseño de las delecciones parte del ensayo de protección a la DNasa I realizado por Recillas-Targa et al. (1993). Cada plásmido fue transfectado al menos 5 veces. El silenciador se representa en amarillo, el promotor α^D en azul y el potenciador (E) en rojo. En morado se muestran las secuencias del silenciador correspondientes a SF1, SF2 y SF3.

INTERACCIONES PROTEÍNA-DNA EN LA REGIÓN DEL SILENCIADOR

Con el objeto de identificar las posibles interacciones proteína-DNA que pudieran aportar información sobre la influencia de factores transcripcionales en la actividad del silenciador durante la diferenciación eritroide, se efectuaron ensayos de movilidad electroforética.

En estos ensayos se observa, para el sitio SF1, una banda de retardo en los tres tipos celulares: 6C2, HD3 y RBC de 10 días, aparentemente del mismo peso molecular (Fig. 26). La disminución en la intensidad de la banda en RBC de 10 días con respecto a la banda generada por los extractos de células 6C2 y HD3, sugiere que la interacción proteica con SF1 disminuye conforme avanza la diferenciación. Este resultado no es consistente con los datos reportados anteriormente (Fig. 10). Es por esta razón que se decidió comprobar, a través de un gel de proteínas, que la cantidad de extractos proteicos agregados a cada una de las sondas fuera similar (Fig. 27).

En los dos ensayos de retardo utilizando las sondas correspondientes a los sitios SF2 y SF3, se revelan dos bandas similares presentes en los tres estadios de diferenciación, cuyo significado puede deberse a la interacción específica de cada uno de estos sitios con dos proteínas distintas o bien, a que una proteína específica interactúa con el sitio y ésta, a su vez, dimeriza con proteínas de pesos moleculares diferentes (Fig. 26).

Aunque se sabe que en 6C2 y en HD3 la estructura de la cromatina no permite el acceso de factores transcripcionales al silenciador (Fig. 11), en estas líneas celulares así como en RBC de 10 días, existe el potencial proteico para activar al elemento negativo. Lo anterior se correlaciona con los resultados obtenidos en las transfecciones transitorias así como lo observado en los ensayos de retardo.

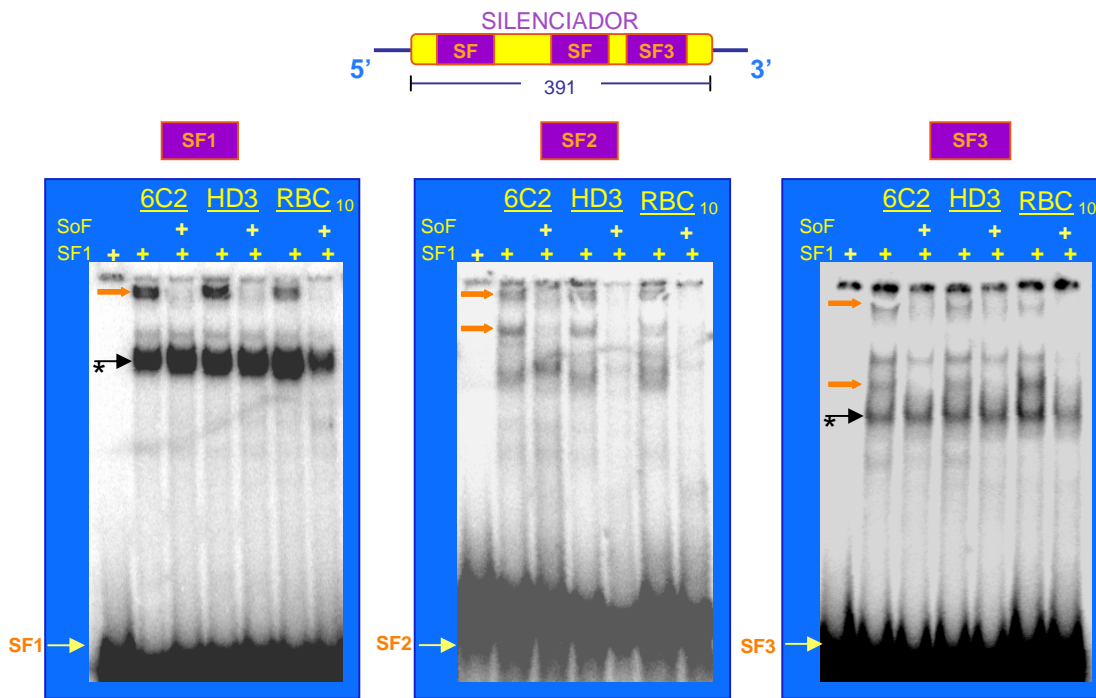


Figura 26. Ensayos de retardo utilizando sondas marcadas correspondientes a los sitios SF1, SF2 y SF3 del silenciador. El rectángulo amarillo representa al silenciador y en rectángulos morados las secuencias SF1, SF2 y SF3. En el primer carril de cada retardo se corrió la sonda sin extractos proteicos (flechas amarillas). Se utilizaron sondas no marcadas radioactivamente (SoF) como competidores fríos. Las flechas naranjas muestran los complejos formados y las flechas con asterisco representan la formación de complejos de retardo inespecíficos.

GEL DE PROTEÍNAS

A partir de los resultados obtenidos con los geles de retardo, se decidió hacer un gel de proteínas para comprobar que la cantidad de extractos proteicos agregados en los experimentos fuera la misma. Aunque el método es cualitativo, el gel muestra que la cantidad de extractos de RBC es menor que la cantidad de extractos de HD3 y 6C2, en estos últimos la cantidad es homogénea (Fig. 27). Por tanto, en los ensayos de retardo efectuados es difícil realizar una comparación de la abundancia proteica para cada una de las sondas en función del desarrollo eritroide.

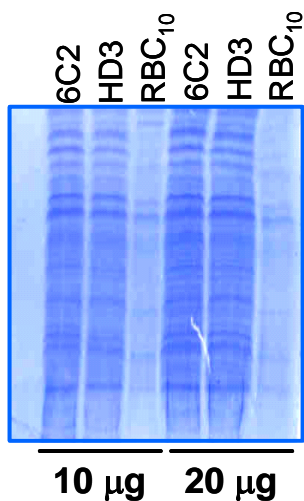


Figura 27. Gel de proteínas. En los primeros tres carriles se cargó el equivalente a 10 µg de extractos proteicos, en los últimos carriles se cargaron 20 µg. Como puede observarse la cantidad de extractos de RBC de 10 días agregada en los ensayos de retardo fue menor.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DEL SILENCIADOR EN EL PROGRAMA TRANSCRIPTIONAL ELEMENT SEARCH SYSTEM (TESS)

Para actualizar la búsqueda de secuencias dentro del silenciador con posible interacción con factores transcripcionales, se realizó un análisis bioinformático utilizando el programa TESS. Esta herramienta utiliza una extensa base de datos de secuencias de DNA consenso que localiza dentro de una secuencia de interés, sitios de unión a factores transcripcionales conocidos.

La primera búsqueda abarcó factores transcripcionales de especies de todo el reino animal y vegetal (Fig. 28). De este universo, se seleccionaron factores relacionados con la hematopoyesis (Tabla 5). Esta depuración se hizo sin importar el porcentaje de homología entre la secuencia de reconocimiento del factor y la secuencia del silenciador.

Como criterios para seleccionar proteínas candidatas de unión al silenciador, se seleccionaron proteínas con actividad represora que participaran en el proceso de hematopoyesis y, además, su secuencia consenso coincidiera 100% con la secuencia del elemento negativo (Fig. 29).

Después de haber corrido el programa y haber aplicado los criterios mencionados anteriormente, el factor proteico RUNX1 es el posible candidato para dirigir la actividad silenciadora (Fig. 29). RUNX1 es un represor involucrado en la regulación del silenciamiento de los genes hematopoyéticos Rag1, Rag2 (Yannoutsos et al., 2004) y CD4 (Taniuchi y Littman, 2004; Durst y Hiebert, 2004). La secuencia consenso de este represor se encuentra en tres sitios distintos del silenciador. Uno de ellos está dentro de la región denominada SF1, mientras que los otros dos se encuentran en la región intermedia entre SF1 y SF2 (Fig. 29).

Considerando que RUNX1 es una proteína represora y que el sitio cae dentro de la región SF1, es posible que esta proteína esté participando en conferir actividad negativa al silenciador.

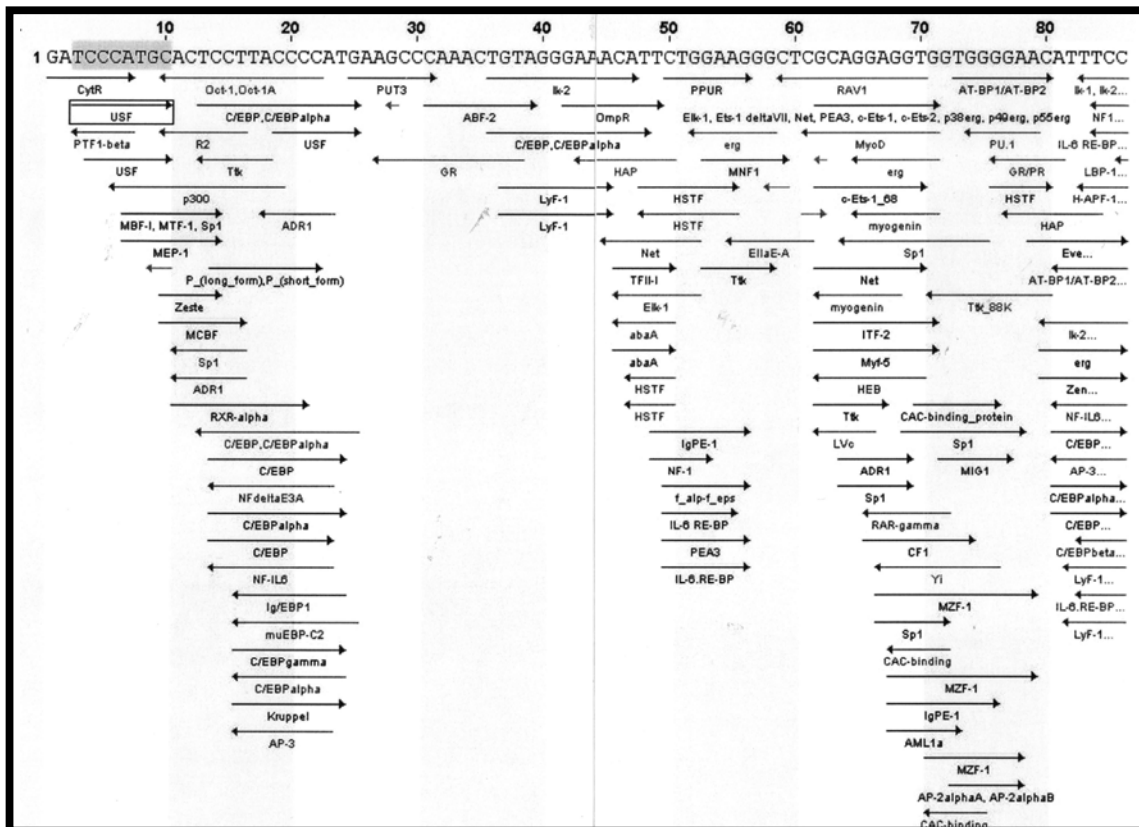


Figura 28. Factores transcripcionales totales predichos por el programa TESS en el silenciador. Sólo se muestran proteínas unidas a las primeras 86 pb del silenciador. La secuencia de unión de cada proteína se indica con una flecha, debajo de la cual se encuentra el nombre del factor. El sentido de cada flecha indica la hebra de DNA que el factor reconoce: 5' → 3' o 5' ← 3'.

Factor Transcripcional	Posición dentro del silenciador	Porcentaje de similitud	Hebra
Ik-2	36	0.69	N
LyF-1	37	0.72	N
	82	0.68	R
IL-6 RE-BP	50	1.00	N
	84	1.00	R
	245	1.00	R
PPUR	51	1.00	N
c-Ets-1_68	62	0.64	N
MZF-1	67	0.65	N
	68	0.92	N
	71	0.97	N
	68	1.00	N
	272	0.75	N
	356	0.80	N
	374	0.84	R
CAC-binding protein	71	1.00	N
Ik-1	83	1.00	R
LCR-F1	95	0.71	N
RUNX1 (AML1)	106	1.00	N
	238	1.00	N
	283	1.00	R
AP1	109	0.68	N
	111	0.62	N
	343	1.00	R
NF-E2	110	0.89	N
HSF2	188	0.90	N
	300	0.63	N
RelA	188	0.67	N
c-Ets-2	192	0.90	R
GATA-3	201	0.61	R
GATA-1	154	0.63	R
	201	0.61	R
	211	0.65	R
	302	0.89	R
	361	0.62	N
F-ACT1	262	1.00	N
PU.1	74	0.74	R
	277	1.00	R
	321	0.90	N
	323	0.77	N
c-Ets-1_54	295	0.72	N
c-Myb	322	1.00	N
Lmo2	308	0.76	R
GATA-2	302	0.72	R
	361	0.64	N

Tabla 5. Factores transcripcionales hematopoyéticos. En la primera columna está el nombre del factor; en la segunda, la localización del inicio de la secuencia consenso reconocida por el factor dentro del silenciador; la tercera, señala el grado de homología entre secuencias y en la cuarta, la hebra de DNA donde se une el factor proteico; R, indica la hebra 5'→ 3' y N la hebra 3'→ 5'. En negritas se muestran los factores cuya secuencia coincide 100% con las secuencias del silenciador.

1 GATCCCATGCACTCCTTACCCCATGAAGCCCAAACGTAGGGAAACATTCTGGAAGGGCT
 1 CTAGGGTACGTGAGGAATGGGTACTTCGGGTTTGACATCCCTTTGTAAGACCTTCCCGA

61 CGCAGGAGGTGGTGGGAACATTTCCAGCGTCTGTCATCGTCTGTGTGGTGACACAGCG
 61 GCGTCCTCCACCACCCTTGTAAGGGTCGCA GACAGTAGCAGACACACCACTGTGTCTC
SF1 Runx1

120 AGGACATGCTGAGGACCTTCTGCACCAGGCAGCTTTCTGTGTATGCCTACAGACTGTGG
 120 TCCTGTACGACTCCTGGAAGACGTGGTCCCGTCGAAAGACACATACGGATGTCTGACACC

180 CCCTCATAGGACTTCCCTGCTTCCATCTCTGATGGAACATGCTTGCTATGTGCCACTTG
 180 GGGAGTATCCTGAAGGGACGAAGGTAGAGGACTACCTTGTACGAACGATACACGGTGAAC

Runx1
 239 TGGGGTCCCAGGGCACACTGAGTGGGCAGACAGGCTGGAGAAGACCACAACACTCCAAC
 239 ACCCCAGGGTCCCGTGTGACTCACCCGTCTGTCCGACCTTCTCTGGTGTGTGAGGTTG
Runx1

298 AGGAACCATCAGCACTTGGGGCTCAGTTCCTGCTCTTTGGGCTATGACCTCAGCAGGGC
 298 TCCTTGGTAGTCGTGAACCCCGAGTCAAGGACGAGAAACCCGATACTGGGGAGACGTCCCG
SF2 SF3

358 AGGGGATGAGCGCAGGGTGAAGCTGA
 358 TCCCCTACTCGCGTCCCACTTCGACT

Figura 29. Sitios de unión al factor transcripcional RUNX1 en el silenciador. Las secuencias reconocidas por las proteínas se subrayan en rojo y las secuencias pertenecientes a SF1, SF2 y SF3, se muestran con rectángulos.

DISCUSIÓN

En 1993, Recillas-Targa y colaboradores encontraron dos elementos de regulación: un potenciador y un silenciador en el costado 3' del gen α^A del dominio α -globina de pollo (Fig. 7). A partir de entonces, se han derivado varios proyectos cuya finalidad es comprender cómo estos elementos participan en la regulación de la expresión génica de los genes α -globina. La presente tesis de investigación se enfoca en la caracterización funcional del silenciador en dos estadios de diferenciación eritroide: en eritroblastos y en eritrocitos de 10 días de gestación.

La caracterización funcional del silenciador se comenzó mediante la determinación de la forma como se afecta su actividad represora al modificar la posición y orientación que guarda en el contexto endógeno con el promotor α^D y el potenciador (Fig. 7). Para abordar esta pregunta, se transfectaron transitoriamente en eritroblastos (HD3) y en eritrocitos de pollo de 10 días de gestación (RBC), plásmidos con combinaciones de los tres elementos reguladores: el promotor α^D , el potenciador y el silenciador.

Los resultados muestran que el silenciador es un elemento de regulación que ejerce su efecto represor sobre diferentes elementos de regulación positiva, sin importar la orientación ni la posición con respecto al potenciador y al promotor α^D . Este comportamiento es observado en ambos tipos celulares: HD3 y RBC de 10 días, lo que implica que las proteínas capaces de activar al silenciador están presentes en ambos estadios de diferenciación (Fig. 22 y 23).

Cabe señalar que aunque el silenciador actúa en HD3 y en RBC de 10 días, la actividad transcripcional que ejerce es distinta; en HD3 el silenciador actúa sobre el promotor α^D y el potenciador, mientras que en RBC de 10 días solo ejerce su actividad sobre el potenciador (Fig. 22 y 23; construcciones 1, 2 y 7). Ello pone de manifiesto que la capacidad de silenciamiento del elemento negativo es diferente

en cada estadio de diferenciación, lo que valida la hipótesis planteada al inicio de este proyecto de investigación.

El dominio α -globina de pollo contiene, río abajo de sus genes blanco, un silenciador y un potenciador adyacentes, no obstante, las transfecciones transitorias demuestran que esta estructura parece no tener relevancia cuando se está regulando la expresión del gen α^D (Fig. 22 y 23; construcciones 5 y 6). Partiendo de que este es el primer sistema donde se describe un silenciador que, no importando su localización, actúa sobre un potenciador, o dicho en la definición de Ogbourne y Antalis, un silenciador que tiene propiedades tanto de NRE como de silenciador clásico (Ogbourne y Antalis, 1998), el dato obtenido en esta tesis de investigación resulta interesante.

Para identificar sitios funcionalmente relevantes dentro del silenciador, se decidió llevar a cabo ensayos de transfecciones transitorias de plásmidos que contuvieran deleciones secuenciales del mismo. Estas transfecciones se hicieron, nuevamente, en los tipos celulares anteriormente mencionados (Fig. 24 y 25). A diferencia de caracterizaciones de silenciadores en los que, con la misma estrategia experimental, se ha logrado identificar al o los módulos que dirigen el silenciamiento (Nomura et al., 2000; Viswanath et al., 2000; Yan et al., 2001; Lin et al., 2004; Reichstein et al., 2005), en los experimentos efectuados en este trabajo la tendencia de los resultados indica que el adecuado funcionamiento del silenciador depende de su integridad.

En particular, la pérdida del sitio SF1 y del segmento 5' adyacente a él, parece ser un factor importante en el debilitamiento de la represión transcripcional (Fig. 23; construcciones 5-7 y Fig. 24; construcciones 4 y 6), este resultado es apoyado por el ensayo de retardo, donde se observaron bandas mejor definidas utilizando al sitio SF1 como sonda y por el análisis bioinformático, el cual predice una posible proteína represora (RUNX1) unida a este sitio.

Las transfecciones sugieren que el mecanismo que regula al silenciador es complejo y, muy probablemente, más de una proteína está involucrada en él. Una explicación atractiva a lo encontrado es que al silenciador se unen diversos factores y que la sumatoria global de los efectos positivos y negativos aportados por cada uno de ellos resulta en la actividad represora del elemento. Este mismo fenómeno ha sido observado antes en elementos reguladores que potencian la transcripción (Wang et al., 2005), si bien, en este sistema de estudio se observa la misma tendencia, pero en un silenciador.

Con el propósito de relacionar la funcionalidad del silenciador con la interacción de factores proteicos asociados a él en diferentes estadios de diferenciación, se llevaron a cabo ensayos de movilidad electroforética retardada, utilizando como sonda las secuencias denominadas SF1, SF2 y SF3. Los resultados muestran que en los tres estadios de diferenciación probados existen interacciones proteicas en las tres secuencias del silenciador utilizadas como sondas.

Finalmente, se realizó una búsqueda bioinformática de los posibles factores transcripcionales involucrados en la activación del silenciador utilizando el programa TESS. Llama la atención la proteína RUNX1.

Dicha proteína RUNX1 es una posible candidata para ser asociada, al menos en parte, a la actividad del silenciador. El mecanismo de silenciamiento de RUNX1 implica el reclutamiento de proteínas que atraen desacetilasas de histonas llevando a una conformación de cromatina compacta (Taniuchi y Littman, 2004).

La propuesta de que el factor RUNX1 pudiera dirigir la actividad del silenciador no descarta la posibilidad de que proteínas que aún no han sido identificadas sean las causantes de dicha actividad.

Aún hacen falta datos experimentales que aporten información en favor o en contra del escenario antes mencionado. Los trabajos futuros sobre el silenciador conducirán a establecer mecanismos que expliquen cómo y cuándo funciona este elemento en un contexto dinámico mucho más amplio, el contexto del dominio α -globina de pollo.

CONCLUSIONES

En la serie de experimentos realizados sobre el silenciador del dominio α -globina de pollo, cuya hipótesis plantea que la funcionalidad de dicho elemento depende del estadio de diferenciación eritroide, se generaron datos que sugieren que el silenciador afecta la actividad del potenciador, actuando independientemente de la posición y orientación con respecto a él y al promotor adulto α^D . De acuerdo con nuestros resultados, se infiere que el silenciador contiene secuencias con actividades positiva y negativa, que actúan de manera sistémica a fin de regular la expresión génica del dominio α -globina de pollo en diferentes estadios de diferenciación eritroide. Resulta claro que esta nueva hipótesis deberá ser validada en un futuro y que, dicha validación, deberá realizarse dentro de un contexto *in vivo*.

De acuerdo a los objetivos generales planteados al inicio de este proyecto de investigación, los datos sugieren:

1. Las transfecciones transitorias de plásmidos con diferente organización de elementos reguladores del dominio α -globina de pollo permitieron determinar que la localización del silenciador respecto al promotor adulto α^D y al potenciador no afecta su actividad represora. El silenciador actúa como un elemento autónomo cuya actividad es independiente de la orientación y la posición en la que se encuentre con respecto a los dos elementos de regulación positiva.
2. Las transfecciones transitorias mencionadas en el párrafo anterior permitieron observar que el efecto del silenciador, tanto en HD3 como en RBC de 10 días, es sobre el potenciador y no sobre el promotor α^D , por lo tanto la actividad represora del silenciador depende de la fuerza del potenciador y del estadio de diferenciación eritroide.

3. A partir de transfecciones transitorias de plásmidos que contienen deleciones secuenciales del silenciador se observó que su actividad, en el contexto endógeno, depende de su integridad. De esto se infiere además que el silenciador está conformado de secuencias positivas y negativas, cuya sumatoria da como resultado su efecto represor.

4. Los ensayos de movilidad electroforética permitieron conocer que en el sitio SF1 del silenciador hay proteínas interactuando en tres estadios de diferenciación: pre-eritroblastos, eritroblastos y eritrocitos de pollo de 10 días de gestación. El análisis informático de la secuencia del silenciador en el programa TESS sugiere a RUNX1 como una proteína que constitutivamente interactúa con SF1.

Pese a que los ensayos comprendidos en esta tesis se orientaron a la caracterización de la funcionalidad del silenciador del dominio α -globina de pollo, queda aún por demostrar cuáles son sus secuencias funcionales relevantes y qué proteínas interactúan con dichas secuencias para dirigir su actividad durante la diferenciación eritroide.

PERSPECTIVAS

La comprensión de la regulación génica del dominio α -globina de pollo comprende la caracterización estructural y funcional de secuencias relevantes de DNA. Del análisis de los resultados de este estudio, se plantea continuar con la caracterización del elemento silenciador y para ello se propone:

1. Determinar si la actividad del silenciador depende de su interacción con otros elementos de regulación positiva de los dominios globina de pollo. Para ello es necesario diseñar construcciones en las que el silenciador se localice junto a diferentes promotores y elementos tipo potenciador.
2. Determinar si la función del silenciador es tejido-específica, para ello se requiere probar la actividad del silenciador en presencia de potenciadores y promotores de otros sistemas biológicos, incluidos los virales.
3. Por medio de un ensayo de protección a la DNasa I de mayor resolución que el realizado por Recillas-Targa y colaboradores (1993), localizar otras secuencias de unión a factores proteicos importantes para el funcionamiento del silenciador.
4. Identificar los factores transcripcionales que dirigen la actividad del silenciador. Como estrategia inicial, se propone diseñar oligonucleótidos que permitan amplificar los sitios de unión al represor RUNX1 y utilizarlos como sondas para llevar a cabo ensayos de retardo y super-retardo.

APÉNDICE

Todos los reactivos utilizados para este trabajo fueron adquiridos a la compañía Sigma-Aldrich, a menos que se indique lo contrario.

- **TRANSFECCIONES**

Medio D-MEM complementado

Para preparar 1L de medio D-MEM complementado, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración, agregar lo siguiente:

80 mL de suero bovino fetal inactivado a 56°C por 30 min. (Gibco BRL)
20 mL de suero de pollo inactivado (Gibco BRL)
10 mL de ampicilina/estreptomicina (Gibco BRL)

Medio L-15 complementado

Para preparar 20 mL de medio L-15 complementado, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración, agregar lo siguiente:

1 mL de suero bovino fetal inactivado a 56°C por 30 min. (Gibco BRL)
400 µL de suero de pollo inactivado (Gibco BRL)
200 µL de ampicilina/estreptomicina (Gibco BRL)
18.4 mL de L-15 (Gibco BRL)

Medio α -MEM para células 6C2

Para 1 litro de α -MEM, al que previamente se ha ajustado el pH entre 7.2 a 7.4 y se ha esterilizado por filtración, agregar lo siguiente:

10% suero bovino fetal inactivado	100 mL (Gibco BRL)
2% suero de pollo	20 mL (Gibco BRL)
ampicilina/estreptomicina	10 mL solución 10000 U/ml (Gibco BRL)
1 mM HEPES	1 mL solución 1 M pH 7.2 (Gibco BRL)
50 μ M 2-mercaptoetanol	900 μ L solución 55 mM (Gibco BRL)

Todos los medios se homogeneizan y almacenan hasta su uso a 4°C.

Amortiguador de lisis para cuantificar RBC

0.5% TX-100
200 mM NaCl

Disolver en H₂O desionizada.

- **GELES DE RETARDO**

Purificación de la sonda

Amortiguador de elución

Acetato de amonio	0.5 M
Acetato de magnesio	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0.1%

Amortiguador de apareamiento (Anelling amortiguador)

Tris HCl pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

Gel de acrilamida 10%-Urea 8%

para 50 mL (1 gel)

Urea	4 g
Acrilamida 30%	16.62 mL
H ₂ O	30.5 μL
TBE 5%	12.5 mL
PSA 10%	350 μL
TEMED	15 μL

Extractos nucleares

PBS	10X
NaCl	80.7 g
KCl	2.01 g
Na ₂ HPO ₄	10.15 g
KH ₂ PO ₄	2.04 g

Disolver en 800 mL y ajustar pH de 7.2 a 7.4. Ajustar Vol. a 1L con agua.

Amortiguador A

HEPES pH 7.9	10 mM
KCl	10 mM
EDTA	0.1 mM
EGTA	0.1 mM
DTT	1.0 mM
PMSF	0.5 mM

Amortiguador C

HEPES pH 7.9	20 mM
NaCl	0.42 M
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
DTT	1 mM
PMSF	1 mM

Interacción proteínas-DNA

Gel shift amortiguador 2x (GSB 2x)

HEPES	40 mM pH 7.9
KCl	100 mM
MgCl	100 mM
Glicerol	10 %
DTT	1 mM

Acrilamida 30%

para 100 mL

Acrilamida	29 g
Bis-acrilamida	1 g

La solución se puede calentar un poco para disolver la acrilamida. Aforar con agua y pasar la solución por un papel filtro.

Gel de acrilamida al 5 %

	para 50 mL (1gel)
Acrilamida 30 %	8.3 mL
TBE 5X	2.5 mL
PSA	350 µL
TEMED	15 µL
H ₂ O	38.8 mL

- GEL DE PROTEÍNAS

Amortiguador resolvidor

12.0 g de Tris base
57.6 g de glicina
40 mL de SDS 10%

Completar a 4 L con agua

Amortiguador espaciador

5.98 g de Tris base

Completar a 100 mL con agua. Ajustar a pH 6.7

Amortiguador muestra (Laemmli Amortiguador)

12.5 mL de Tris-HCl pH 6.8
10.0 mL de glicerol
3.0 g SDS
2.5 mL de 2-mercaptoetanol

Mezclar y cuando se adicione el SDS a la solución, añadir cristales de azul de bromofenol hasta obtener el color deseado. Llevar a un volumen de 50 mL con agua.

BIBLIOGRAFÍA

- Ansel, K., Greeneald, R., Agarwal, S., Bassing, C., Monticelli, S., Interlandi, J., Djuretic, I., Lee, D., Sharpe, A., Alt, F. y Rao, A. 2004. Deletion of a conserved *Il4* silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nature*. 5 (12): 1251-1259.
- Barberis, A. y Petrascheck, M. 2003. Transcription activation in eukariotic cells. *ELS*. John Wiley & Sons. 1- 7.
- Bernstein, E. y Allis, E. 2005. RNA meets chromatin. *Genes & Dev*. 19: 1635-1655.
- Blackwood, E. y Kadonaga, J. 1998. Going the distance: a current view of potenciador. *Science*. 281 (5373):61-63.
- Brasset, E. y Vaury, C. 2005. Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity*. 94 (6): 571-576.
- Bruns, G. e Ingram, V. 1973. The erythroid cells and haemoglobins of the chick embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 266 (877): 225-305.
- Bulger, M. y Groudine, M. 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes & Dev*. 13 (19):2465-2477.
- Bulger, M. y Groudine, M. 2002. TRAPping potenciador function. *Nature*. 32: 555-556.
- Butler, J. y Kadonaga, J. 2001. Potenciador-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes & Dev*. 15 (19):2515-2519.
- Capelson, M. y Corces, V. 2004. Boundary elements and nuclear organization. *Biol Cell*. 96: 617-629.
- Cremer, T. y Cremer, C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nature*. 2: 292-301.
- Durst, L. y Hiebert, S. 2004. Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene*. 23: 4220-4224.
- Felsenfeld, G. y Groudine, M. 2003. Controlling the double helix. *Nature*. 421 (6921): 448-453.
- Foley, K. y Engel, J. 1992. Individual stage selector element mutations lead to reciprocal changes in β - vs. ϵ -globin gene transcription: genetic confirmation of promoter competition during globin gene switching. *Genes & Dev*. 6: 730-744.
- Geyer, P. y Parnell, T. 2001. Chromosomes: Higer Organization. *ELS*. John Wiley & Sons. 1-8.
- Grdisa, M. y White, M. 2003. Molecular and biochemical events during differentiation of the HD3 chicken erythroblastic cell line. *Int J Biochem Cell Biol*. 35 (4): 422-431.
- Hesse, J., Nickol, J., Lieber, M. y Felsenfeld, G. 1986. Regulated gene espression in transfected primary chicken erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83 (12): 4312-4316.
- Kamakaka, R. 1997. Silencers and *locus* control regions: opposite sides of the same coin. *Trends Biochem Sci*. 22 (4): 124-128.
- Kashima, T. y Manley, J. 2003. A negative element in *SMN2* exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nature*. 34 (4): 460-463.

- Kimura, A. y Horikoshi, M. 2004. Partition of distinct chromosomal regions: negotiable border and fixed border. *Genes Cells*. 9 (6): 499-508.
- Kosak, S. y Groudine, M. 2004. Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes & Dev*. 18: 1371-1384.
- Kuhn, E. y Geyer P. 2003. Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol*. 15 (3): 259-265.
- Latchman, D. 2001. Transcriptional gene regulation in eukaryotes. ELS. John Wiley & Sons. 1-6.
- Li, Y., Fu, X., Liu, D. y Liang, C. 2004. Opening the chromatin for transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 36: 1411-1423.
- Lin, C., Chen, Y., Lee, H. y Tsai, H. 2004. Novel *cis*-element in intron 1 represses somite expression of zebrafish *myf-5*. *Gene*. 334: 63-72.
- Loo, S. y Rine, J. 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11: 519-548.
- Mason, M., Grasso, J., Gavrilova, O. y Reitman, M. 1996. Identification of functional elements of the chicken epsilon-globin promoter involved in stage specific interaction with the beta/epsilon potenciador. *J Biol Chem*. 271 (41): 25459-25467.
- Mymryk, J., Fryer, C., Jung, L. y Archer, T. 1997. Analysis of Chromatin Structure *in Vivo*. *Methods*. 12 (1): 105-114.
- Nomura, M., Tsujimura, A., Begum, N., Matsumoto, M., Wabiko, H. y Toyoshima, K. 2000. Identification and characterization of a silencer regulatory element in the 3'-flanking region of the murine *CD46* gene. *Biochem J*. 351: 353-365.
- Ogbourne, S. y Antalis, T. 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J*. 331 (1): 1-14.
- Orphanides G. y Reinberg, D. 2002. A unified theory of gene expresión. *Cell*. 108 (4): 439-451.
- Recillas-Targa, F. 2000. The chicken α y β -globin gene domains and their chromatin organization. *Cell Mol Biol Lett*. 5: 451-467.
- Recillas-Targa, F., De Moura Gallo, C., Huesca, M., Scherrer, K. y Marcaud, L. 1993b. Silencer and potenciador elements located at the 3'-side of the chicken and duck α -globin gene domains. *Gene*. 129: 229-237.
- Recillas-Targa, F. y Escamilla-Del-Arenal, M. 2004. Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. *Mensaje Bioquímico*. 23: 173-200.
- Reichenstein, M., German, T. y Barash, I. 2005. BLG-el A novel regulatory element in the distal region of the β -lactoglobulin gene promoter. *FEBS Lett*. 579 (10): 2097-2104.
- Rincón-Arango, H., Valadez-Graham V., Guerrero G., Escamilla-Del-Arenal, M. y Recillas-Targa, F. 2005. YY1 and GATA-1 interaction modulate the chicken 3'-side α -globin potenciador activity. *J Mol Biol*. 349 (5):961-975.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3th edition. Volume 1. Ed. Cold Spring Harbor. USA. Pág. 1.32-1.34.
- Smale, S. 2001. Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes & Dev*. 15 (19):2503-2508.
- Smale, S. y Kadonaga, J. 2003. The RNA polimerase II promoter. *Annu Rev Biochem*. 72: 449-479.

- Taniuchi, I. y Littman, D. 2004. Epigenetic gene silencing by the RUNX proteins. *Oncogen*. 23: 4341-4345.
- Valadez-Graham, V. y Recillas-Targa, F. 2001. Características y formación de un dominio transcripcionalmente activo en eucariotes. *REB*. 21 (1): 21-40.
- Viswanath, R., Rose, S., Swift, G. y MacDonald, R. 2000 A binary mechanism for selective action of a pancreatic β -cell transcripcional silencer. *J Biol Chem*. 275(51):40273-40281.
- Wu, Y., Diab, I., Zhang, X., Izmailova, E. y Zehner, Z. 2004. Stat3 enhances vimentin gene expression by binding to the antisilencer element and interacting with the repressor protein, ZBP-89. *Oncogene*. 23(1): 168-178.
- Yannoutsos, N., Barreto, V., Misulovin, Z., Gazumian, A., Yu, W., Rajewski, N., Peixoto, B., Eisenreich, T. y Nussenzweig, M. 2004. A *cis* element in the recombination activating gene *locus* regulates gene expression by counteracting a distant silencer. *Nature*. 5 (4): 443-450.
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cataudella, T., Leavitt, B., Hayden, M., Timmusk, T., Rigamonti, D. y Cattaneo, E. 2003. Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcripcion of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature*. 35 (1):76-83.